

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, Лилия Егорова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марина Доронина

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. К. Божено, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)

Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)

Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)

Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)

М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)

Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)

С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)

Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)

С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)

Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в Scopus с 2017 года

Scopus®

Журнал включён в WoS с 2018 года

WEB OF SCIENCE™

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3

**Google
scholar**

Журнал включён в РИНЦ, IF 2017: 0,304

**НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU**

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Здесь находится открытый архив журнала

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2018-04

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 20.10.2018
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

EDITORS Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

TECHNICAL EDITOR Nina Tyurina

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bogomil'skiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus since 2017

Scopus®

Indexed in RSCI. IF 2017: 0,304

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Indexed in WoS since 2018

WEB OF SCIENCE™

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Five-year h-index is 3

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2018-04

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 20.10.2018

Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР

5

Надлежащая организация системы биобезопасности как средство снижения уязвимости общества, экономики и государства перед биогенными угрозами

В. А. Гушчин, В. А. Мануйлов, В. В. Макаров, А. П. Ткачук

The proper structure of a biosafety system as a way of reducing the vulnerability of a society, economy or state in the face of a biogenic threat

Gushchin VA, Manuilov VA, Makarov VV, Tkachuk AP

МЕТОД

22

Многopараметрическая детекция бактериального обсеменения с помощью анализа изменений распространения поверхностных волн в фотонных кристаллах

И. О. Петрова, В. Н. Конопский, А. В. Суханова, И. Р. Набиев

Multiparametric detection of bacterial contamination based on the photonic crystal surface mode detection

Petrova IO, Konopsky VN, Sukhanova AV, Nabiev IR

МЕТОД

29

Высокопроизводительный аэрозольный пробоотборник с рециркуляцией жидкой фазы и предварительным концентрированием

А. Э. Акмалов, Г. Е. Котковский, С. В. Столяров, Б. И. Вердиев, Р. С. Овчинников, А. А. Почтовый, А. П. Ткачук, А. А. Чистяков

High-performance aerosol sampler with liquid phase recirculation and pre-concentration of particles

Akmalov AE, Kotkovskii GE, Stolyarov SV, Verdiev BI, Ovchinnikov PS, Pochtovyy AA, Tkachuk AP, Chistyakov AA

МЕТОД

37

Опыт использования аналитического стенда для проведения аэрозольных испытаний в контролируемых условиях

Д. А. Клейменов, Б. И. Вердиев, А. А. Ененко, В. А. Гушчин, А. П. Ткачук

Performance of the original workstation for aerosol tests under controlled conditions

Kleymenov DA, Verdiev BI, Enenko AA, Gushchin VA, Tkachuk AP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

45

Сравнение режимов возбуждения флуоресценции полупроводниковых квантовых точек на основе селенида кадмия для биомедицинских приложений

Ю. А. Кузищин, И. Л. Мартынов, Е. В. Осипов, П. С. Самохвалов, А. А. Чистяков, И. Р. Набиев

Comparison of fluorescence excitation modes for CdSe semi-conductor quantum dots used in medical research

Kuzishchin YA, Martynov IL, Osipov EV, Samokhvalov PS, Chistyakov AA, Nabiev IR

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

53

Исследование антимикробной активности полифенолов из древесного сырья

А. Б. Шевелев, Е. П. Исакова, Е. В. Трубникова, Н. Ла Порта, Ш. Мартенс, О. А. Медведева, Д. В. Трубников, Р. М. Акбаев, Ю. К. Бирюкова, М. В. Зылькова, А. А. Лебедева, М. С. Смирнова, Ю. И. Дерябина

A study of antimicrobial activity of polyphenols derived from wood

Shevelev AB, Isakova EP, Trubnikova EV, La Porta N, Martens S, Medvedeva OA, Trubnikov DV, Akbaev RM, Biryukova YK, Zylkova MV, Lebedeva AA, Smirnova MS, Deryabina YI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

57

Идентификация микроорганизмов с помощью инфракрасных Фурье-спектров

А. Ю. Сунцова, Р. Р. Гулиев, Д. А. Попов, Т. Ю. Вострикова, Д. В. Дубоделов, А. Н. Щеголихин, Б. К. Лайпанов, Т. В. Припутневич, А. Б. Шевелев, И. Н. Курочкин

Identification of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy

Suntsova AYu, Guliev RR, Popov DA, Vostrikova TYu, Dubodelov DV, Shchegolikhin AN, Laypanov BK, Priputnevich TV, Shevelev AB, Kurochkin IN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

66

Параметры фармакокинетики ванкомицина у больных с нарушением функции почек в послеоперационном периоде: сравнение результатов фармакокинетического исследования и математического моделирования

Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, М. В. Лукина, Т. Б. Андрущишина, М. А. Чукина, И. Л. Царев, О. А. Вартанова, Т. Е. Морозова

Parameters of vancomycin pharmacokinetics in postoperative patients with renal dysfunction: comparing the results of a pharmacokinetic study and mathematical modeling

Ramenskaya GV, Shokhin IE, Lukina MV, Andrushchishina TB, Chukina MA, Tsarev IL, Vartanova OA, Morozova TE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

74

Оценка эффективности метода МРТ сердца в диагностике дисфункционального миокарда

Я. К. Рустамова, Г. Г. Иманов, В. А. Азизов

Evaluation of cardiac MRI efficacy in the diagnosis of hibernating myocardium

Rustamova YK, Imanov GG, Azizov VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

80

Эффективность создания делеции CCR5delta32 методом CRISPR-Cas9 в эмбрионах человека

Т. А. Кодылева, А. О. Кириллова, Е. А. Тыщик, В. В. Макаров, А. В. Хромов, В. А. Гущин, А. Н. Абубакиров, Д. В. Ребриков, Г. Т. Сухих

The efficacy of CRISPR-Cas9-mediated induction of the CCR5delta32 mutation in the human embryo

Kodyleva TA, Kirillova AO, Tyschik EA, Makarov VV, Khromov AV, Gushchin VA, Abubakirov AN, Rebrikov DV, Sukhikh GT

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

85

Уровень внеклеточной ДНК и активность ДНКазы I при нормальной и осложненной беременности

К. Г. Аветисова, С. В. Костюк, Э. В. Костюк, Е. С. Ершова, Г. В. Шмарина, Н. Н. Вейко, Д. С. Спиридонов, П. А. Клименко, М. А. Курцер

Levels of cell-free DNA and DNase I activity in complicated and normal pregnancies

Avetisova KG, Kostyuk SV, Kostyuk EV, Ershova ES, Shmarina GV, Veiko NN, Spiridonov DS, Klimenko PA, Kurtser MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

91

Сравнительная оценка частоты мертворождаемости в Брянской области, странах Европейского союза и Содружества Независимых Государств (1995–2014 гг.)

А. В. Корсаков, В. Хоффманн, Л. И. Пугач, Д. Г. Лагереv, В. В. Королик, М. Б. Булацева

Comparative assessment of stillbirth rate in Braynsk Region, EU and CIS countries (1995–2014)

Korsakov AV, Hoffmann V, Pugach LI, Lagerev DG, Korolik VV, Bulatseva MB

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

100

Распространение токсокарозной инвазии у домашних собак и кошек в городских условиях

О. П. Курносова, И. М. Одоевская, С. Петкова, В. Дильчева

Prevalence of toxocara infection in domestic dogs and cats in urban environment

Kurnosova OP, Odoevskaya IM, Petkova S, Dilcheva V

НАДЛЕЖАЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ КАК СРЕДСТВО СНИЖЕНИЯ УЯЗВИМОСТИ ОБЩЕСТВА, ЭКОНОМИКИ И ГОСУДАРСТВА ПЕРЕД БИОГЕННЫМИ УГРОЗАМИ

В. А. Гушчин^{1,2} ✉, В. А. Мануйлов³, В. В. Макаров⁴, А. П. Ткачук³

¹ Лаборатория механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

² Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

³ Лаборатория трансляционной биомедицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

⁴ ФГБУ Центр стратегического планирования Министерства здравоохранения России, Москва

Оценка потенциальной уязвимости общества, экономики и государства перед биогенными угрозами сводится прежде всего к поиску слабых звеньев существующей системы обеспечения биологической безопасности государства. К ним можно отнести как отсутствие отдельных элементов и технических средств мониторинга биологических рисков, так и недостаточность имеющихся аналитических средств для принятия своевременных мер по предупреждению биологических угроз или устранению их последствий. В целом действующие на сегодняшний день в России системы мониторинга биологических угроз достаточно хорошо развиты. Однако их отдельные элементы, во-первых, ведомственно разобщены, что не позволяет создать единую систему с общей координацией, а во-вторых, ни один из них по отдельности не дает результатов, соответствующих всем требованиям, предъявляемым к такой информации. Так, в России действуют, как минимум, четыре отдельные государственные системы сбора информации по эпидемической и эпидемиологической ситуации, которые с должной эффективностью решают узкие задачи по инфекционному мониторингу, но, к сожалению, не способны дополнять друг друга из-за отсутствия единого аналитического центра с доступом ко всем данным. На сегодняшний день отсутствие единого мониторингового центра в области биологической безопасности является фактором потенциально высокой уязвимости общества, экономики и государства перед лицом биогенных угроз. Необходима надлежащая организация современной полнофункциональной и эффективной национальной системы мониторинга биологических угроз как основа для функционирования общенациональной службы обеспечения биологической безопасности и одновременно как средство для идентификации и устранения собственных уязвимых элементов такой государственной структуры.

Ключевые слова: биологическая безопасность, мониторинг биологических угроз, патогенные микроорганизмы

Финансирование: статья подготовлена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках программы «Национальная система химической и биологической безопасности 2015–2020» и Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com

Статья получена: 30.09.2018 **Статья принята к печати:** 14.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.054

THE PROPER STRUCTURE OF A BIOSAFETY SYSTEM AS A WAY OF REDUCING THE VULNERABILITY OF A SOCIETY, ECONOMY OR STATE IN THE FACE OF A BIOGENIC THREAT

Gushchin VA^{1,2} ✉, Manuilov VA³, Makarov VV⁴, Tkachuk AP³

¹ Laboratory of Population Variability Mechanisms in Pathogenic Microorganisms, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

² Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

³ Laboratory of Translational Medicine, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

⁴ Center for Strategic Planning of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

To understand how vulnerable are a society, an economy and a state in the face of a biohazard, one should attempt to identify any potential holes in the national biosafety system, such as the lack of important components or technologies for biological monitoring and the inadequacy of existing analytical methods used to prevent or counteract biogenic threats. In Russia, biological monitoring is quite advanced. However, the agencies that ensure proper functioning of its components lack collaboration and do not form a well-coordinated network. Each of such agencies alone cannot provide comprehensive information on the subject. In the Russian Federation, there are at least 4 state-funded programs that collect epidemiological data and are quite efficient in performing the narrow task of monitoring infections. But because there is no central database where epidemiological data can be channeled and subsequently shared, these agencies do not complete each other. This leaves the Russian society, economy and state vulnerable to biogenic threats. We need an adequately organized, modern, fully functional and effective system for monitoring biohazards that will serve as a basis for the national biosafety system and also a tool for the identification and elimination of its weaknesses.

Keywords: biological safety, biological monitoring, pathogens

Funding: this work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation as part of the project *The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020)* and by the Ministry of Education and Science as part of the project RFMEFI60117X0018.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir A. Gushchin
Gamalei 18, Moscow, 123098; wowaniada@gmail.com

Received: 30.09.2018 **Accepted:** 14.10.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.054

Необходимость постоянной оценки биологических рисков и угроз

Термин «биологическая безопасность» охватывает всю сферу санитарно-эпидемиологического состояния, смежные с ней области ветеринарно-санитарного, фитосанитарного контроля, экологической безопасности, среды обитания и используется при мероприятиях по предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций (ЧС) биологического характера. Признаком ЧС является высокая степень негативного влияния на жизнедеятельность человека, сопоставимая с угрозой национальной и международной безопасности [1, 2]. Здесь уместно дать определение двум основным понятиям, используемым в настоящем обзоре: «биологический (биогенный) риск» — это вероятность причинения вреда (с учетом его тяжести) здоровью человека и/или нанесения ущерба (с учетом его размера) окружающей среде опасными биологическими факторами; «биологическая угроза» определяется как неприемлемый биологический риск [1]. Таким образом, сама по себе биологическая угроза является ЧС.

Биогенные риски, создающие угрозу безопасности в каждой стране и мире в целом, очень разнообразны. Их первопричиной является фундаментальное свойство патогенных биологических агентов (ПБА), т. е. бактерий, вирусов, токсинов, прионов, простейших, проявлять вирулентные свойства по отношению к организму человека, а также к животным и растениям, используемым в сельском хозяйстве. Несмотря на успехи отечественного и мирового здравоохранения, инфекционные заболевания по-прежнему остаются одной из основных причин потери трудоспособности и смертности среди населения. По оценкам экспертов, в 2017 г. экономический ущерб для России только от 32 наиболее актуальных нозологических форм инфекций превысил 627 млрд. руб. [3]. Стоит отметить, что наибольший вклад как в заболеваемость, так и в показатель экономического урона вносят отнюдь не экстраординарные случаи заболеваний особо опасными, «вспышечными», вновь возникающими или завезенными инфекциями, а традиционные сезонные, эндемичные для России ОРВИ, грипп, туберкулез, острые кишечные инфекции, ветряная оспа, ВИЧ-инфекция и вирусные гепатиты [3].

Способы контроля за инфекционными заболеваниями хорошо известны и широко применяются: вакцинопрофилактика, внедрение средств своевременной этиологической диагностики, применение специфических противовирусных и антибактериальных препаратов, повышение уровня общей гигиены и медицинской асептики, противодействие основным негативным эпидемиологическим факторам, в конце концов — повышение социально-экономического благополучия общества в целом [4]. Однако из-за самой биологической природы инфекций эффективность перечисленных способов быстро снижается со временем в результате эволюции возбудителей, избегающих этих новых факторов естественного отбора [5]. Следствием снижения этой эффективности являются такие общеизвестные процессы, как регулярная смена штаммов (серотипов, генотипов) возбудителей сезонных и/или эпидемических респираторных и алиментарных заболеваний; схожесть нозологических и эпидемиологических процессов, вызываемых возбудителями различных таксонов (и, соответственно, по разному восприимчивых к средствам профилактики, диагностики и терапии); появление и распространение мутантных

штаммов возбудителей, способных преодолевать барьеры иммунизации и диагностический контроль; появление мутантных штаммов, устойчивых к действию специфических терапевтических препаратов, появление новых ПБА, ранее не циркулировавших в человеческой популяции, проникающих из природных резервуаров инфекции. Динамичные изменения в структуре циркулирующих ПБА накладываются на нередко резко выраженную неоднородность эффективности вакцинации и доступности диагностических и терапевтических средств в различных географических, возрастных и социальных группах населения. Все эти факторы инфекционных процессов необходимо всесторонне и своевременно отслеживать для предотвращения эпидемического характера распространения ПБА (т. е. трансформации биологического риска в реальную угрозу) [6]. Для этого органам государственного здравоохранения и надзора безусловно необходимо иметь в своем распоряжении максимально эффективный организационный инструмент для изучения существующей инфекционной ситуации в стране и прогнозирования направлений ее развития.

Необходимость организации единой системы мониторинга биологических рисков в целях предотвращения биологических угроз прямо определена в программных документах Правительства РФ и действующих нормативно-правовых актах на уровне Федерального законодательства [1, 7–9]. В частности, «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу» [8] определяют в качестве приоритетных направлений и задач государственной политики мониторинг биологических рисков, а также развитие ресурсного обеспечения соответствующих функциональных элементов национальной системы биологической безопасности РФ. В «Стратегии национальной безопасности Российской Федерации», опубликованной в конце 2015 г. [9], органам государственной власти и органам местного самоуправления во взаимодействии с институтами гражданского общества, предписывается развитие системы мониторинга биологической обстановки на территории Российской Федерации.

Авторы настоящей статьи считают необходимым дать рекомендации, касающиеся организации единого координирующего центра межведомственного взаимодействия [10], с тем чтобы не допустить дублирования существующих сегодня систем отечественного эпидемиологического надзора, поскольку, как отмечалось выше, уязвимости в системе биологической безопасности могут быть прямо приравнены к уязвимостям всего государства и общества.

Отсутствие единой системы мониторинга биологических угроз

На сегодняшний день в Российской Федерации на уровне государства используются четыре основных способа сбора эпидемической и эпидемиологической информации. Они применяются для решения частного круга задач по общему инфекционному мониторингу:

- анализа заболеваемости населения наиболее распространенными нозологическими формами инфекций;
- расследования вспышек заболеваний;
- контроля инфекционной опасности объектов окружающей среды и товаров народного потребления;

– изучения локальной встречаемости социально-значимых инфекций и действия эпидемиологических факторов в группах риска;

– изучения и прогнозирования смены сезонных и периодических штаммов некоторых эпидемических инфекций.

Рассмотрим эти способы по отдельности.

1. *Анализ заболеваемости распространенными формами инфекций* осуществляется Роспотребнадзором [11]. Информация собирается на уровне региональных и муниципальных лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ). Ставя диагноз инфекционного заболевания, врач информирует об этом региональный центр Роспотребнадзора путем заполнения форм государственной статистической отчетности [12]. Сбор, обработка и публикация статистических данных осуществляется Роспотребнадзором ежегодно.

Несомненными достоинствами такого способа сбора информации являются: широкий охват населения во всех регионах — фактически учитывается встречаемость ПБА у всех обратившихся к врачам пациентов; устойчивость такой системы мониторинга, обеспечивающая распределенность и непрерывность исследований и связанная с большим количеством задействованных ЛПУ; однородность предоставляемых данных, обеспечиваемая единообразием форм документации.

В то же время, особенность данного вида учета связана с самим определением показателя заболеваемости, рассчитываемого как отношение числа больных с впервые установленным диагнозом к среднегодовой численности населения [13], т. е. регистрируется количество только официально выявленных случаев инфицирования среди самостоятельно обратившихся пациентов. Остаются неучтенными люди, страдающие неманифестными хроническими формами заболевания, не пожелавшие обратиться к врачу, или с неправильно установленным диагнозом, но при этом являющиеся распространителями инфекции. Это приводит к нерелевантности обследуемой группы, не позволяющей достоверно оценить распространенность инфекции в общей популяции. Также отметим, что в большинстве случаев сотрудники ЛПУ не располагают технологической базой для тонкой расшифровки этиологии ПБА, особенно в отношении респираторных и острых кишечных заболеваний. Совершенно разные в этиологическом, эпидемиологическом и биологическом отношении инфекции, требующие специальных средств профилактики и лечения, учитываются одинаковым образом, т. е. недостоверно.

Сбор и анализ статистических данных, поступающих из ЛПУ, позволяет постфактум оценивать многолетнюю динамику заболеваемости, и строить тренды для этого показателя. Однако такой метод является косвенным (не дает достоверной информации о реальной встречаемости инфекций в популяции, т. е. величине инфекционного резервуара и уязвимости общества перед ним), имеет низкое разрешение в отношении этиологии возбудителей, и не обладает предиктивной силой, особенно в отношении редких и вновь возникающих инфекций.

Анализ документальной прививаемости населения также осуществляется Роспотребнадзором на основе статистических форм, предоставляемых региональными ЛПУ. Прививаемость не является прямым показателем эпидемических процессов, но используется как один из важнейших параметров в моделировании развития инфекционной ситуации. Показано, что документальная

прививаемость не может служить этим целям, и что для надежного прогнозирования эпидемических процессов этот показатель должен быть уточнен путем прямого сероэпидемиологического измерения уровня популяционного иммунитета к вакциноуправляемым и ряду других инфекций [6].

2. *Государственный санитарно-эпидемиологический надзор* [14] осуществляется региональными и федеральными Центрами гигиены и эпидемиологии (ЦГиЭ) Роспотребнадзора [11, 15]. В основную сферу их деятельности в отношении инфекций входят плановые и внеплановые проверки объектов окружающей среды (воды, товарной продукции, земельного фонда и т. д.) на наличие ПБА из утвержденного списка, большая часть которых относится к возбудителям природно-очаговых инфекций, острых кишечных инфекций и гельминтозам [16–18], а также расследования в отношении вспышек инфекций [13].

Аналогичные функции, но в отношении ветеринарных инфекций, в том числе опасных для человека, возложены на межобластные и региональные ветеринарные лаборатории Россельхознадзора, также осуществляющие задачи инфекционного мониторинга. Однако имеющаяся в Россельхознадзоре информация не поступает в органы здравоохранения и не учитывается ими.

Надзорные функции в отношении ПБА выполняются системой ЦГиЭ в значительной мере эффективно, что обусловлено развитой региональной лабораторной сетью и оснащением ее современным высокотехнологичным оборудованием и тест-системами. Это обеспечивает непрерывность проведения планового мониторинга инфекций, возможность установления точной этиологии ПБА, а также способность оперативно фиксировать появление неэндемичных ПБА и возбудителей эпидемических, особенно опасных и/или природно-очаговых инфекций и расследовать их распространение при вспышках.

В то же время, регламентированные рутинные функции Роспотребнадзора в отношении мониторинга инфекций ограничены достаточно узким перечнем ПБА [16, 17], методов их идентификации [18] и спектром типовых объектов исследования, что не позволяет определить реальную встречаемость инфекций (даже профильных) среди населения страны, а соответственно уязвимость перед ними в масштабе государства.

Исполнительные органы Роспотребнадзора располагают значительным опытом и инструментарием для детекции возбудителей алиментарных, зоонозных и природно-очаговых инфекций и расследования вызываемых ими вспышек заболеваний, но практически не участвуют в контроле парентеральных и эпидемических респираторных инфекций, хотя экономический и социальный ущерб от последних в разы выше, чем ущерб от относительно редких для России вспышечных инфекций [3].

В целом, можно заключить, что существующая система государственного санитарно-эпидемиологического надзора успешно решает важные, но узкоспециализированные практические задачи, только отчасти релевантные инфекционному мониторингу населения страны в широком смысле.

3. *Научно-исследовательский эпидемиологический мониторинг* в отношении ограниченного спектра ПБА в отдельных группах населения или географических областях периодически осуществляется государственными научными учреждениями Роспотребнадзора, Минздрава

Мониторинг биологических угроз: текущее состояние

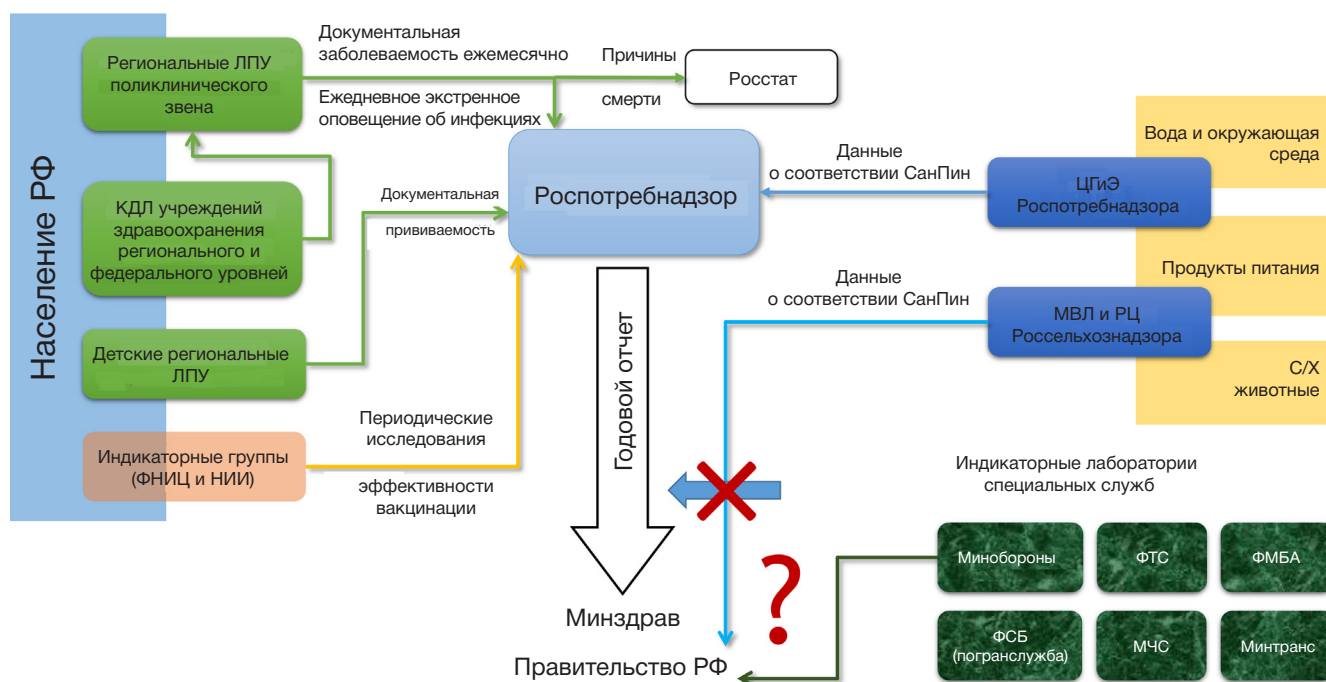


Рис. 1. Современная схема мониторинга биологических угроз

и Минобрнауки РФ. Такие исследования проводятся в рамках выполнения государственных заданий (ранее — федеральных целевых программ), или в инициативном порядке в соответствии с собственными научными планами и финансовыми возможностями. Как правило, научные учреждения не имеют прямо поставленной ведомственной задачи осуществлять постоянный мониторинг инфекций в статистических целях, но некоторые из них приобрели статус центров по контролю за определенными видами ПБА (например, Федеральный научно-методический центр СПИД на базе ЦНИИ Эпидемиологии, сотрудничающий центр ВОЗ по гриппу на базе ГНЦ ВБ «Вектор», или Национальный научно-методический центр по надзору за корью в МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского) и располагают соответствующими референтными лабораториями для диагностических исследований. Именно от таких научных центров поступает, например, информация о сезонных циркулирующих штаммах и серотипах некоторых ПБА (в частности, вируса гриппа), что имеет важное значение для профилактики.

Работы в таких центрах, как правило, выполняются на высоком научно-технологическом уровне, что обеспечивает значительную чувствительность и специфичность в отношении диагностики и установления этиологии различных ПБА, а также соответствуют надлежащим правилам эпидемиологической науки. В результате определяется реальная встречаемость ПБА в той или иной группе риска среди условно здорового населения или в выбранной референтной группе, что обеспечивает высокую степень достоверности такой информации.

Однако нельзя не отметить, что научные учреждения в основном выполняют подобные исследования локально, с нерегулируемой периодичностью (что связано с особенностями их финансирования) и в отношении только «профильных» для них ПБА. Таким образом, в данном случае тоже нельзя говорить о непрерывности или широком

охвате этих эпидемиологических исследований. Кроме того, здесь сложно судить о единой системе мониторинга, так как результаты исследований предоставляются в свободном виде (как правило, в форме научных статей в разных источниках и/или отчетов), что не позволяет интегрировать их с имеющейся медицинской статистикой, особенно с учетом ведомственной разобщенности задействованных научных учреждений.

4. *Медико-санитарные ведомственные службы* также собирают данные о заболеваемости в той или иной группе населения (и о заражении отдельных объектов окружающей среды). К ним относятся специализированные части Федеральной службы безопасности, Министерства обороны, Федеральной таможенной службы, Федеральное медико-биологическое агентство (ФМБА), Министерство чрезвычайных ситуаций (МЧС), Министерства транспорта и пр. Однако собираемая ими информация предназначена исключительно для внутреннего использования и, по данным авторов настоящей статьи, никак не учитывается в деятельности гражданского здравоохранения. Таким образом, перечисленные структуры (по крайней мере, в мирное время), никак не участвуют в общегосударственном мониторинге инфекционных процессов.

Обобщая, можно заключить, что существующие в современной России элементы системы мониторинга инфекционных заболеваний достаточно хорошо развиты (рис. 1), однако, во-первых, не позволяют объединить усилия в этой области из-за различной ведомственной принадлежности исполнителей, а во-вторых, ни одна из них по отдельности не соответствует всем критериям количества и качества предоставляемой информации (релевантности по отношению ко всему населению, этиологической детализации и оперативности информации). Самая же большая проблема заключается в том, что все описанные способы не являются взаимодополняющими из-за отсутствия единого аналитического центра с доступом ко всем данным.

В этой связи создание единого центра мониторинга позволит преодолеть указанные недостатки при соблюдении нужных принципов осуществления мониторинга [10]. При этом такой центр не должен дублировать функции перечисленных ведомств (такие как анализ заболеваемости, расследование вспышек и анализ безопасности продукции, научные эпидемиологические исследования в группах риска). Создаваемая система должна напрямую измерять параметры распространенности ПБА у населения, их типов и серологических маркеров к ним в целях решения поставленных задач по снижению уязвимости общества, экономики и государства перед биогенными угрозами.

Работа мониторингового центра должна организационно и функционально дополнять действующую систему реагирования на чрезвычайные ситуации медико-биологического характера и повышать ее эффективность за счет значительного сокращения времени реагирования на чрезвычайные ситуации. Схема мониторинга биологических рисков в представлении авторов предложена на рис. 2.

В то же время, эффективная работа по обеспечению национальной биологической безопасности должна учитывать не только организационные моменты по взаимодействию между различными надзорными органами и интеграцию данных различных систем сбора информации. Уязвимость общества перед биологическими угрозами во многом определяется и иными, фундаментальными свойствами как самих ПБА, так и способов их индикации.

Влияние человеческого фактора на проведение анализов. Медленная скорость проведения индикации патогенных биологических агентов

Интеграция существующих источников информации об имеющихся биологических рисках в динамическом

режиме в рамках единого центра позволит существенно ускорить время реакции на появление биологических угроз. Между тем, самостоятельной угрозой является то, что существующих источников информации для оперативного мониторинга недостаточно, либо они не в полной мере отвечают требованиям специфичности, чувствительности, оперативности, автономности, автоматической работы. В частности, время реакции на информацию о потенциально угрожающем биологическом событии, получаемой от обычной клинико-диагностической лаборатории ЛПУ или Центра гигиены и эпидемиологии (даже хорошо оснащенной) оказывается недопустимо большим — если учесть, что в него включено не только время, затрачиваемое на само проведение исследования, передачу данных и принятие решения, но и время, которое требуется носителю инфекции, чтобы осознать наличие заболевания (т. е. весь инкубационный период), обратиться к врачу, сдать анализ и т. д.

Поэтому перспективная система мониторинга биогенных рисков должна быть основана не только на агрегации лабораторных данных, получаемых от КДЛ, но и на основе создания собственной сети источников информации о биологических рисках, включающей автоматизированные средства индикации ПБА в режиме «реального времени» [19].

Прогресс в области лабораторной диагностики биопатогенов дает возможность создавать наряду с традиционными методами, требующими участия квалифицированного персонала, экспресс-методики с минимальной долей ручного труда оператора и автоматизированные комплексы, работающие без участия человека [19]. При сохранении чувствительности и специфичности, новые подходы сокращают время проведения анализа от суток до часов и минут.

Мониторинг биологических угроз: перспективная схема

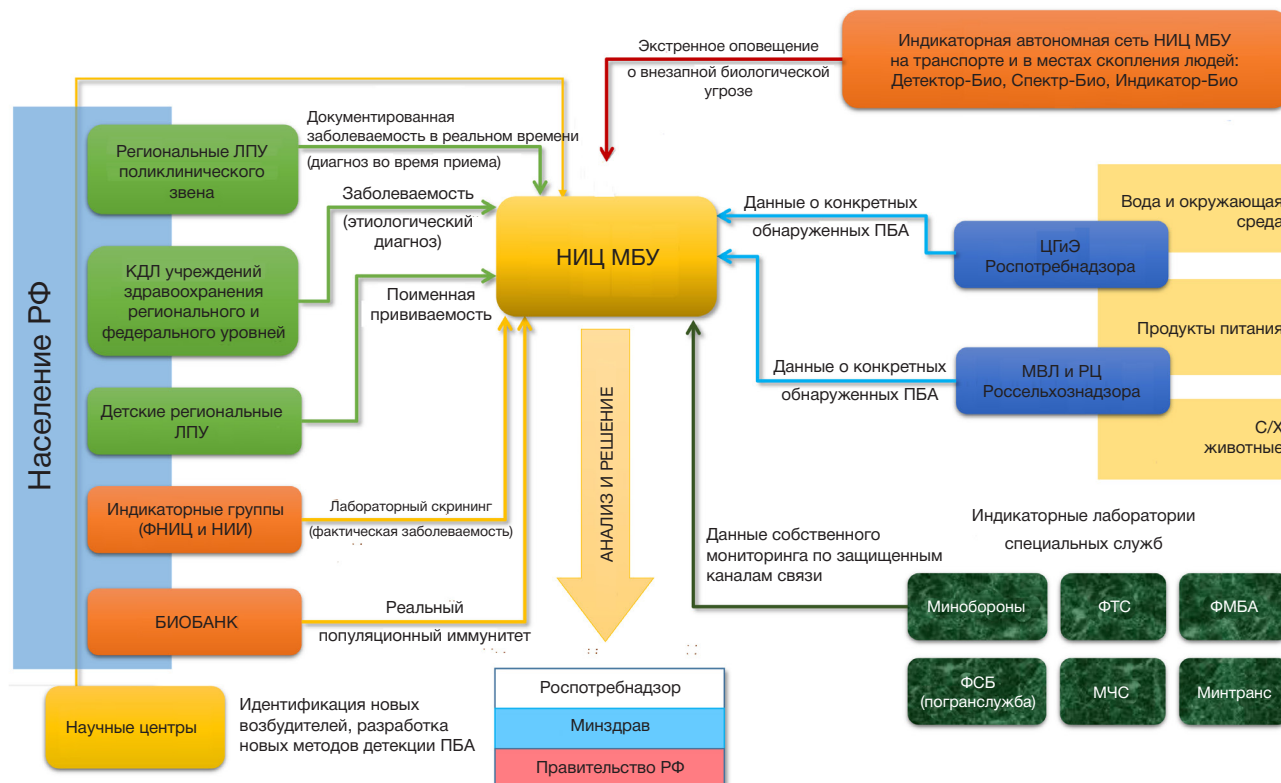


Рис. 2. Мониторинг биологических угроз при условии наличия единого Научно-исследовательского центра мониторинга биологических угроз (НИЦ МБУ)

Автоматизированные комплексы в автономном исполнении могут анализировать образцы окружающей среды на наличие патогенов практически непрерывно.

Прямой анализ воздушного аэрозоля позволяет выявить возбудителей инфекционных заболеваний до момента заражения индивидуумов, что с учетом латентного периода может сократить время ранней диагностики на несколько суток, а в случае своевременного принятия мер решительно сократить число людей, подвергшихся заражению. Сэкономленное время можно использовать для развертывания массовой вакцинации или превентивной терапии (введение иммуноглобулинов) среди населения.

На сегодняшний день очевидно, что для автоматической детекции широкого спектра биопатогенов в окружающей среде — бактерий, вирусов, токсинов — наиболее надежным видится применение иммунологического анализа и анализа нуклеиновых кислот [19]. Первый обеспечивает обнаружение не только клеточных и внеклеточных форм ПБА, но и продуктов их жизнедеятельности. Второй более чувствителен при анализе малого количества исходного материала [19]. Одновременная детекция двумя методами существенно снижает риск ложноположительных результатов [19, 20], а возможность количественного определения анализа повышает информативность индикаторного теста.

В то же время требование автономности работы приборов в полностью автоматическом режиме в течение длительного времени накладывает ограничения на применяемые методики. Они должны содержать минимальное количество стадий, сохранять приемлемую

чувствительность (не менее 1000 инфекционных частиц патогена/мл аэрозольного концентрата) и специфичность в сочетании с экспресс-пробоподготовкой, обеспечивать максимально короткое время анализа. Сфера применения автоматических комплексов детекции биопатогенов в воздухе и требование мобильности налагает ограничения на их внешние размеры. Используемые системы автоматизации методов детекции должны иметь минимальные размеры, выдерживать транспортировку без необходимости дополнительного технического тестирования, обеспечивать длительную бесперебойную работу в неблагоприятных внешних условиях, поддерживать герметичность соединений для исключения кросс-контаминации и загрязнения внутреннего объема прибора. Обслуживание прибора, удаление отработанных материалов должны обеспечивать безопасность персонала.

Несмотря на очевидную необходимость контроля аэрозоля на наличие возбудителей инфекционных заболеваний или токсинов, реальное применение автоматического прибора анализа биоаэрозоля будет сильно зависеть от возможностей самого устройства: скорости анализа, чувствительности и специфичности, возможности количественного определения концентрации патогена в воздухе, стоимости устройства, расходных материалов и обслуживания, количества одновременно определяемых патогенов, а также спектра разработанных тест-систем [6, 21, 22]. Все перечисленное должно быть учтено при развертывании сети автоматических средств индикации создаваемого единого центра мониторинга биологических угроз.

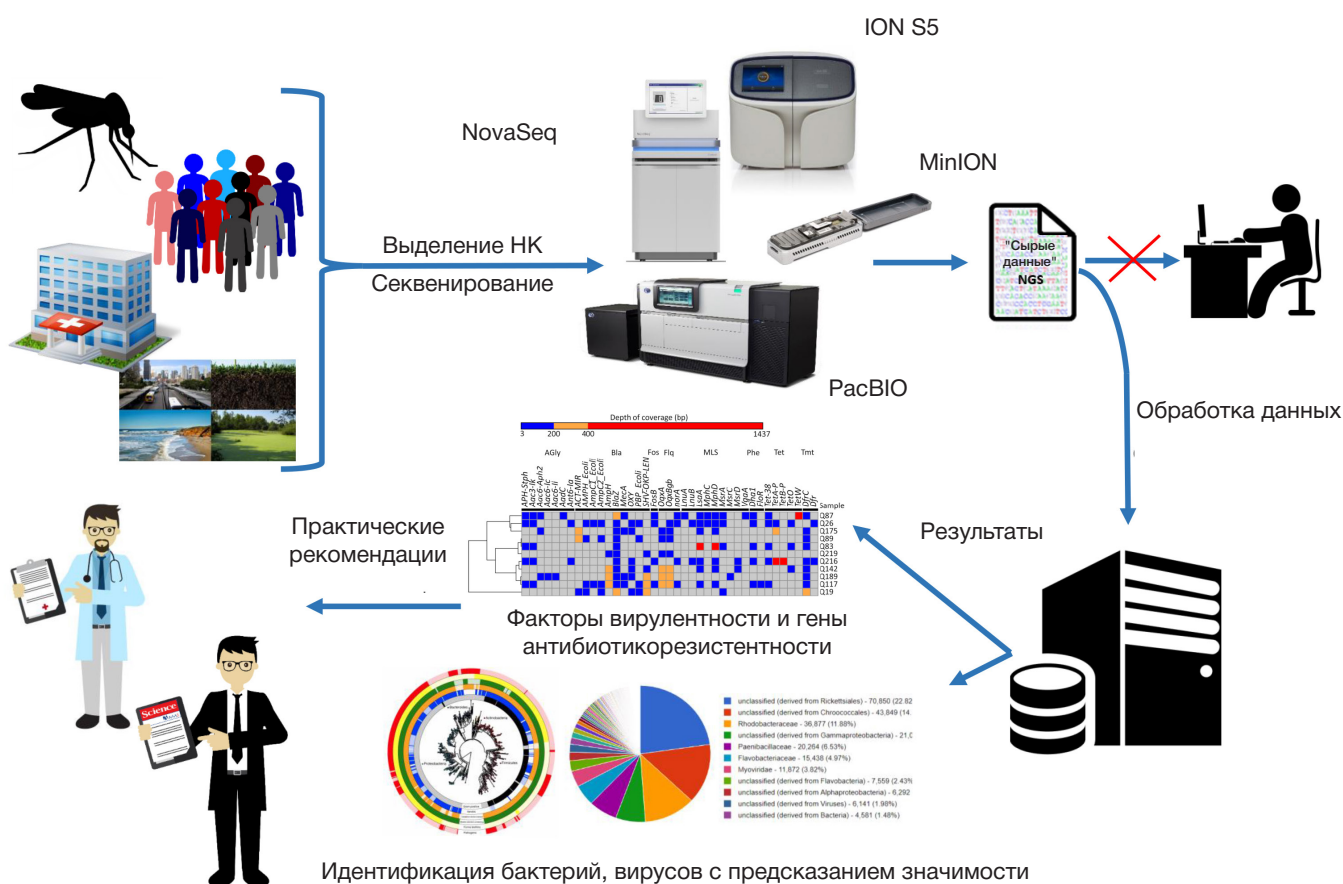


Рис. 3. Алгоритм идентификации новых патогенов, факторов вирулентности и антибиотикорезистентности бактериальных патогенов. НК — нуклеиновые кислоты

Проблема идентификации ранее неизвестных патогенов и патогенов с новыми свойствами

Как уже отмечалось выше, в последние годы быстро растет количество бактерий с лекарственной устойчивостью, в разных регионах мира регулярно детектируются возбудители новых инфекционных заболеваний, а риск применения биологического оружия, в том числе в рамках биотеррористических акций остается достаточно высоким. В связи с этим возрастает актуальность разработки и использования новых технологий идентификации неизвестных патогенов, в том числе с новыми не описанными свойствами.

Использование микробиологами и врачами-инфекционистами платформ высокопроизводительного секвенирования обеспечило значительный прогресс в медицинской сфере. Благодаря широкому распространению коммерчески доступных платформ секвенирования нового поколения (NGS), таких как Miseq and Hiseq (Illumina), GS (Roche-454), Ion Torrent (Life Technologies), Minion (Oxford Nanopore Technologies) и PacBio (Pacific Biosciences), определение последовательностей геномов ПБА (или их регионов) внесло значительный вклад в клиническую микробиологию и вирусологию, позволяя создавать различные диагностические инструменты на их основе [23]. Помимо этого, обеспечивая доступ к полному набору генов различных штаммов, NGS дает уникальную возможность определения потенциала вирулентности и предсказания антибиотикорезистентности обнаруженных изолятов. Идентификация и характеристика факторов вирулентности, особенно токсинов и маркеров антибиотикорезистентности патогенов необходимы для понимания патогенеза заболеваний, вызываемых бактериями, и их взаимодействия с организмом-хозяином, а также для разработки новых лекарственных средств, вакцин и тестов для молекулярной диагностики [10, 24].

Возможность использования метода секвенирования следующего поколения в микробиологии и эпидемиологии открывает совершенно новые горизонты для определения новых патогенов и глубокого изучения их свойств (рис. 3).

Методы NGS на данный момент уже применяются в некоторых медицинских микробиологических лабораториях, включая, например, лабораторию в University Medical Center Groningen (UMCG), где они используются для контроля над развитием вспышек инфекций, молекулярно-эпидемиологических исследований, характеристики патогенов и наблюдения за ними, быстрой идентификации бактерий с использованием области rPHK 16S–23S, таксономии, для метагеномных подходов к клиническим образцам и для определения передачи зоонозных инфекций от животных к людям.

Преимущество использования полногеномного секвенирования (*whole genome sequencing*, WGS) в том, что оно обеспечивает внедрение NGS в эпидемиологические исследования и исследования общественного здоровья [25–26]. Помимо отслеживания вспышек и их характеристики, использование WGS позволяет также предпринимать контрольные меры против распространения резистентных бактериальных клонов. Например, вспышка заболевания, вызванная колистин-резистентными продуцирующими карбапенемазы бактериями *K. pneumoniae*, распространившаяся между несколькими клиниками в Нидерландах, контролировалась путем направления всех носителей резистентного

штамма в отдельное медицинское учреждение, где специализированная команда лечила этих пациентов [27].

Помимо детекции бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, методика WGS также эффективна для характеристики высоковирулентных бактерий, таких как шигатоксин-продуцирующая *Escherichia coli* (*shigatoxin-producing Escherichia coli*, STEC) O104:H4, вызвавшая вспышку заболевания в Германии в 2011 г. [28].

Молекулярная идентификация возбудителей часто используется в исследовании вспышек инфекций. Базы данных NGS и WGS могут быть ретроспективно проанализированы в случае вспышек, вызванных несколькими возбудителями. Результатом этого может быть определение возбудителей, которые не были идентифицированы в ходе эпидемиологических исследований, основанных на использовании ПЦР или серологических методов [29–30].

Текущая рутинная процедура характеристики патогенов основывается на большом спектре бактериологических, биохимических и молекулярных методов, что делает ее трудоемкой, требующей временных затрат и дорогостоящей. NGS может служить надежным односложным инструментом для исследования широкого спектра свойств патогенов, применимым к большому диапазону патогенов [31–33]. Знание профиля вирулентности патогена имеет решающее значение для прогнозирования тяжести заболевания, результатов лечения и для оценки риска в случае раннего начала заболевания. WGS может внести существенный вклад в определение наличия факторов вирулентности с использованием нескольких онлайн-инструментов, поскольку он не ограничивается специфическим геном [34, 35].

В одном из больших когортных исследований метод WGS использовали для молекулярной характеристики STEC, что давало четкое представление о структуре популяции и геномной пластичности этого штамма в городах Гронинген и Роттердам (Нидерланды) [36]. Вся релевантная информация может быть извлечена *in silico* из баз данных по сиквенсам, включая генотип, серотип, данные мультислокового секвенирования, профили вирулентности и антибиотикорезистентности и филогенетические данные для получения общих молекулярных признаков с высокой степенью селективности среди близкородственных штаммов. Метод NGS позволил подробно описать и сравнить многие штаммы в течение относительно короткого промежутка времени. Таким образом, для быстрого и оптимального молекулярно-эпидемиологического надзора за патогенами в региональном и национальном масштабах роль WGS неоспорима. Метод NGS эффективен также для выявления новых генов резистентности как у ныне существующих бактерий, так и у исторических штаммов. Новые варианты генов антибиотикорезистентности можно идентифицировать с использованием NGS, а дальнейшие эксперименты помогут определить, действительно ли эти гены отвечают за наблюдаемый паттерн антибиотикорезистентности [37].

NGS позволяет осуществить детекцию теоретически неисчислимого количества патогенов без использования культур и вследствие этого способствует пониманию полного микробиома. Метагеномика, по мнению некоторых авторов, будет итоговым подходом к детекции всех микроорганизмов [38]. Однако для анализа больших объемов данных требуется сочетание биоинформационных и вычислительных ресурсов, которые в настоящее время по большей части отсутствуют в диагностических

медицинских микробиологических лабораториях. Кроме того, метагеномные подходы требуют много времени, так как время выполнения анализа составляет около 4–5 дней.

Чтобы заполнить пробел между общепринятыми методами по обнаружению и идентификации видов микроорганизмов (культуральными микробиологическими и ПЦР) и метагеномикой, представляется перспективным подход, основанный на таргетном NGS без высева культуры (рис. 3). По сравнению с метагеномикой он быстрее, дешевле и проще методологически, в связи с чем, вероятно, в обозримом будущем займет достойное место в арсенале рутинных диагностических лабораторий. Было доказано, что последовательность гена 16S рПНК является надежным генетическим маркером идентификации бактерий на уровне рода (в ряде случаев вида и даже штамма), поскольку он присутствует у всех бактерий и его функция неизменна [39]. Секвенирование последовательности гена может быть выполнено непосредственно из клинического материала (без наращивания чистой культуры) и, вследствие этого, идентификация спектра бактерий по последовательности 16S рПНК уже сейчас является ценным дополнительным тестом в повседневной клинической практике [40, 41]. Однако выраженное сходство в последовательностях гена между определенными видами бактерий может приводить к неоднозначной идентификации [42].

Недавно был разработан инновационный подход NGS 16S–23S рПНК без использования культур для детекции бактерий в клинических образцах. Метод показал ряд преимуществ по сравнению с аналогичными способами анализа. Он корректно идентифицирует патогены, определенные как причина инфекции, культуральным методом в образцах мочи [43]. Более того, метод позволяет осуществить одновременную идентификацию нескольких патогенов в биологическом материале, в котором ранее ни культуральным методом, ни методом ПЦР возбудитель не выявлялся. Несомненно, такой новый подход внесет значимый клинический вклад в развитие микробиологии, а также повлияет на тактику лечения пациентов, оптимизируя антибиотикотерапию. Наконец, этот метод позволит клиническим микробиологическим лабораториям внедрить NGS в рутинную практику и будет способствовать развитию технологического и биоинформационного обеспечения, необходимого для внедрения метагеномики в диагностику заболеваний в будущем.

В самом деле, использование WGS в таксономических целях позволяет включить больше генов для разграничения видов, чем классическая ДНК–ДНК-гибридизация или методы секвенирования 16S рПНК, тем самым повышая разрешающую способность. Более того, поскольку WGS можно использоваться для филогенетической реконструкции на основе последовательностей всех генов, присутствующих в геноме, соответствующая генетическая дендрограмма может быть воспроизведена более отчетливо [44]. Высказывались предположения о том, что описания новых таксонов должны также включать геномные последовательности по меньшей мере с двадцатикратным повторным прочтением [45].

NGS в будущем позволит получить также больше информации о зоонозной передаче ПБА. Первые исследования по этой теме были основаны на методах с низкой селективностью, таких как серотипирование [46]. Совсем недавно опубликованы работы, в которых более селективные методы, такие как электрофорез в

импульсном поле или мультилокусный анализ областей генома с переменным числом tandemных повторов, были использованы для обнаружения специфических бактериальных клонов у животных и людей [47]. Многие аспекты биологических механизмов зоонозного распространения инфекций еще нуждаются в уточнении, особенно когда речь идет о частоте передачи (например, единичный или повторный контакт с животными или продуктами животного происхождения), факторах риска, ассоциированных с заражением зоонозным микроорганизмом (например, потенциально опасные действия, такие как близкое взаимодействие с животными или обработка стула сельскохозяйственных животных) и о том, как использование антибиотиков у животных влияет на передачу патогенных бактерий людям. NGS открывает новые перспективы для изучения этих аспектов. Высокая селективность метода позволит дифференцировать ранее не различимые бактериальные штаммы, поражающие животных и человека. Это, вкупе с эпидемиологической информацией, позволит детализировать источники потенциальных зоонозных инфекций [47–48].

Таким образом, можно отметить, что использование метагеномного подхода и NGS позволяет провести комплексный анализ патогена, включая изучение профиля антибиотикорезистентности, продукции токсинов, а также других факторов патогенеза, способности к межвидовой передаче данных факторов. Между тем, несмотря на высокий потенциал использования метагеномного анализа и NGS в составе систем идентификации ранее неизвестных патогенов и патогенов с новыми свойствами, применение этих методов в клинической практике ограничено единичными случаями.

Появление новых патогенных биологических агентов или новых патогенных свойств

Вспышки инфекционных заболеваний создают постоянную угрозу для населения. Большое внимание уделяется появлению относительно новых или неизвестных патогенов, например, ближневосточного респираторного коронавирусного синдрома и вируса Эболы в Заире. Однако значительно чаще эпидемии вызывают известные патогены, такие как вирус гриппа, денге, возбудитель туберкулеза или холерный вибрион. Большинство эпидемий возникает из-за внешних, климатических или географических факторов. Однако иногда их причиной становится антропогенное воздействие. Фактически каждые несколько лет возникает новая опасность, вызванная появлением и распространением новых патогенных организмов. В литературе описаны факты появления новых инфекционных агентов в 21 веке [49]. Яркими примерами антропогенного влияния человека на появление новых ПБА (или приобретение ими новых свойств) являются распространение антибиотикорезистентных штаммов и модификация ПБА в целях биотерроризма.

Антибиотикорезистентность возбудителей инфекционных заболеваний человека

Резистентность патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам, в том числе множественная, широко распространена и является важнейшим фактором снижения эффективности лечения инфекционных заболеваний почти во всех регионах мира. ВОЗ определяет эту проблему

как «угрозу национальной безопасности многих стран». Актуальность угрозы, исходящей от распространения антибиотикорезистентных микроорганизмов для России, отмечена в ряде работ [50–60].

Открытие и применение ряда антибиотиков с конца 1930-х годов спасло жизни миллионов людей от острых бактериальных инфекций. Так, пенициллин G стал «магической пулей», препаратом, принципиально сократившим смертность во время второй мировой войны от стрептококковой инфекции. К тому времени, когда появились первые резистентные к пенициллину штаммы, были разработаны антибиотики второго поколения, такие как метициллин, цефалотин, имипенем. Но уже в 1961 г. был выделен метициллинрезистентный штамм золотистого стафилококка, MRSA. Вскоре стали идентифицировать клинические штаммы, устойчивые к стрептомицину, хлорамфениколу и тетрациклину. В дальнейшем на основании опыта, накопленного с начала эры антибиотиков, стало очевидным, что устойчивость формируется ко всем известным антибактериальным препаратам. Практически для всех антибиотиков после начала клинического применения резистентность развивается фактически за 1–2 года. Это привело к тому, что многие фармацевтические компании замедлили или прекратили программы по разработке новых антибиотиков, поскольку такие препараты стало сложнее коммерциализовать из-за их низкой эффективности. Так, с 1987 г. не было открыто ни одного нового класса антибиотиков, и на сегодняшний день разрабатывается слишком мало антибактериальных препаратов, чтобы решить проблему множественной лекарственной устойчивости [61]. Достижения мирового здравоохранения находятся под угрозой, так как глобально распространяющаяся резистентность к противомикробным препаратам не обеспечивает защиту пациентов от потенциально смертельных болезней и не позволяет проводить с наименьшим риском такие жизненно важные процедуры, как хирургические операции и химиотерапию [62–65].

Распространение резистентности к антибиотикам в первую очередь обусловлено возрастающим неконтролируемым приемом, а также нерациональным их использованием. По данным мировой статистики примерно в 75% случаев назначение антибактериальных препаратов неоправданно [64]. Монорезистентные штаммы микроорганизмов постепенно становятся полирезистентными, затем и панрезистентными. Появилось понятие «проблемных» микроорганизмов. Это микроорганизмы, среди которых наиболее часто, особенно в условиях стационара, где широко применяются антибактериальные препараты и дезинфектанты, встречаются штаммы, резистентные ко многим, а иногда и ко всем известным противомикробным средствам. К таким проблемным микроорганизмам относятся золотистый стафилококк, синегнойная палочка, клебсиелла, энтерококки, пневмококки и др. [66].

Формирующаяся генетически детерминированная устойчивость связана с целым рядом хорошо изученных механизмов, среди которых инактивация антибиотика, модификация мишени действия, приобретение или увеличение активности молекулярных помп для выведения антибиотика из микробной клетки, нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки, формирование метаболического «шунта» [67]. Эти знания дают возможность детектировать резистентные микроорганизмы непосредственно, методом ПЦР или секвенирования, без посева на средах, содержащих

антибиотики и даже без идентификации видовой принадлежности бактерии (поскольку гены устойчивости к антибиотикам часто передаются горизонтально даже между представителями разных таксонов). Таким образом, имеется технологическая возможность (и необходимость) детектировать распространение антибиотикорезистентных штаммов как отдельного вида биологической угрозы в рутинной деятельности создаваемого центра мониторинга.

Синтетическая биология и биотерроризм

Несмотря на то, что Женевский протокол, ратифицированный еще в 1925 г., и в настоящее время подписанный 65 государствами, запрещает разработку, производство и использование в военных действиях биологического и химического оружия, преднамеренное использование ПБА предполагалось только в качестве компонентов биологического оружия при ведении военных действий [68]. Впервые Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) идентифицировала применение биологического и химического оружия в разгар войны во Вьетнаме, что привело к принятию резолюции ООН 2162В (XXI) от 1967 г., осуждающей все подобные действия, противоречащие Женевскому протоколу. В 1970 г. в ВОЗ был подготовлен доклад «Медико-санитарные аспекты применения химического и биологического оружия», обновленный в 2004 г. руководством «Ответные меры системы общественного здоровья при применении биологического и химического оружия» [69]. Этот документ включает рекомендации по выявлению вспышек новых необычных болезней и реагированию на них. Руководство описывает также стандартизированные рекомендации по наблюдению и предоставлению адекватной медицинской помощи в случаях таких чрезвычайных ситуаций. По определению ВОЗ к биологическому относится оружие, достигающее намеренной цели посредством инфицирования болезнетворными микроорганизмами и другие подобными агентами, в том числе вирусами, инфекционными нуклеиновыми кислотами и прионами.

В настоящее время производство биологического оружия технологически легко доступно и открытая разработка не ведется только лишь вследствие опасений в отношении негативного международного общественного мнения или возмездия. Тем не менее многие страны обладают целым рядом возможностей использования биологического оружия. С 1928 г. некоторые страны имели наступательные программы биологической войны, и, скорее всего, до сих пор имеют возможность их реализовать [70]. США (до 1972 г.) и бывший Советский Союз (до 1992 г.) имели большие и тщательно проработанные доктрины ведения биологической войны. Обе страны разработали более десятка биологических агентов, в том числе токсинов, нацеленных на то, чтобы убить или вывести из строя людей и уничтожить растениеводство и животноводство на территориях потенциального противника [71, 72]. Вместе с тем использование биологических агентов в ходе военных действий запрещено Конвенцией о применении биологического и токсичного оружия (КБТО). С 1972 г. странам, подписавшим конвенцию, не разрешено проводить исследования с целью разработки биологического оружия, а также производить и накапливать БО. КБТО была подписана и ратифицирована в 170 странах. Однако отсутствуют какие-либо реальные механизмы проверки выполнения Конвенции. И разработку биологического оружия, и его производство довольно легко «спрятать» в биотехнологической инфраструктуре

страны. Кроме того, Конвенция о биологическом оружии требует от стран, подписавших ее, «не разрабатывать, не производить, не накапливать или иным образом приобретать или сохранять микробиологические или другие биологические агенты или токсины, независимо от их происхождения или метода производства, в таких количествах, которые не имеют никакого оправдания для профилактических, защитных или других мирных целей». Таким образом, Конвенция не определяет точно, какие именно биологические агенты или токсины, запрещены, и какие их количества будут выходить за рамки, установленные Конвенцией. Однако страна (независимо от того, подписала она КБТО или нет), рискнувшая открыто разрабатывать или производить биологическое оружие имеет высокий шанс стать международным изгоем.

Биологический терроризм, осуществляемый в мирное время в различных целях, первоначально приравнивался к локальным угрозам в масштабе страны. Вероятность масштабирования последствий биотеррористического акта до уровня национальной безопасности носила гипотетический характер. Однако угроза биотерроризма стала реальностью после того, как в почтовой системе США были скрытно распространены письма с возбудителями сибирской язвы. В результате этой акции умерли пять человек, включая троих, непосредственно контактировавших с зараженной почтой, более 20 были инфицированы и несколько тысяч человек вынуждены принимать сильные антибиотики. Письма, содержащие споры возбудителя сибирской язвы или их имитаторы, обнаружены в десятках других стран, включая Россию.

Биотерроризм определяется как преднамеренное распространение вирусов, бактерий или других агентов с целью вызвать болезнь или смерть людей, а также гибель животных или растений [73]. Целями биотерроризма, как правило, являются желание вызвать страх, панику, социальные волнения или экономические потери; в основе актов могут лежать идеологические, религиозные или политические убеждения. Террористы стремятся достичь своей цели с помощью ужаса, вызванного насилием. Кроме того, существует апокалиптические секты, такие как Аум Синрике, стремящиеся вызвать массовые жертвы для достижения своих собственных религиозных целей. Однако террористы обычно действуют внутри определенных государств, структуры безопасности которых стремятся обнаружить и обезвредить их. Необходимость работать «под носом» у правоохранительных органов и относительно ограниченные финансовые и инфраструктурные возможности, с одной стороны, серьезно затрудняют возможности террористов в разработке и осуществлении успешной биологической атаки значимого масштаба. С другой стороны, успех для большинства из них, скорее всего, будет определен масштабом возникшей общественной истерии, и необязательно должен сопровождаться огромным количеством жертв [74–76].

Наконец, необходимо упомянуть и о биопреступлениях. Биопреступление подразумевает использование биологического агента с целью убийства одного человека или небольшой группы лиц, мотивированное местью или денежной выгодой, в большей степени, чем политическими, идеологическими, религиозными или другими убеждениями. Среди примеров биопреступлений можно назвать использование рицина с целью избавления от нежелательного партнера или инфицирование

микроорганизмом *Shigella dysenteriae*, произведенное сотрудницей лаборатории больницы [77]. Убийство болгарского диссидента Георгия Маркова в Лондоне в 1978 г. с использованием рицин-содержащих гранул, введенных с помощью зонта, также можно считать актом биопреступления.

Масштабы финансовых последствий биотерроризма против человека и сельского хозяйства могут быть просто катастрофическими [75, 78–81].

До настоящего времени биотерроризм унес существенно меньше человеческих жизней, по сравнению с более традиционными формами терроризма с использованием оружия и взрывчатых веществ. Однако риск того что использование в качестве БО инфекционных агентов может привести к значительным жертвам, реален, хотя и не слишком велик. Например, длительность инкубационного периода, как правило, позволяет диагностировать патоген до пика симптоматических проявлений для многих биологических агентов, используемых в качестве БО. Кроме того, за исключением мультирезистентных супербактерий, эффективное лечение антибиотиками доступно для большинства, по крайней мере бактериальных, агентов.

Описано два принципиальных подхода к конструированию боевых ПБА:

а) перенос ранее существовавшего патогена от одного хозяина на другого, сопровождающийся тяжелым течением заболевания вследствие отсутствия адаптации у организма нового хозяина к воздействию патогена;

б) появление новых патогенных свойств у уже известного биологического агента, обычно реализуемых в ходе горизонтального переноса генов.

Использование первого подхода для создания новых биологических угроз до недавнего времени выглядело маловероятным, однако появление синтетической биологии сильно изменило шансы. Детальные механизмы, позволяющие предсказать какие конкретно мутации в геноме патогена приведут к возникновению возможности переноса его на нового хозяина, являются предметом активного изучения вирусологов и микробиологов, что делает перспективу создания БО на этой основе технически реализуемой [82–85].

Успехи современной синтетической биологии дают основания полагать, что в ближайшее время можно ожидать появления доступных методов синтеза новых организмов с заданными (программируемыми) свойствами для различных фундаментальных и прикладных целей. Ключевые открытия были сделаны коллективами Крейга Вентера и Дэниела Гиббсона. Они первыми показали возможность получения новых синтетических видов микроорганизмов с дизайнерским геномом [82–85].

Современный потенциал синтетической биологии сводится к нескольким ключевым функциям:

1) комбинированный химико-энзиматический синтез длинных фрагментов искусственно синтезированных фрагментов ДНК;

2) компьютерный дизайн отдельных генов и целых геномов с заданными метаболическими функциями;

3) высокоэффективная сборка и коррекция искусственно синтезированных геномов в простых биологических системах (клетки бактерий и одноклеточных эукариот);

4) полностью автоматизированный удаленный синтез ДНК, РНК, белков (токсинов), вирусов и бактерий без участия человека роботизированными комплексами из простых химических соединений.

Перечисленные возможности позволяют в ближайшее время с помощью синтетической биологии:

1) проводить экспресс-разработку вакцин и вакцинных штаммов вирусов и бактерий любой природы, включая новые и неизвестные, без использования патогена в качестве исходного материала. Все что нужно — это знать последовательность генома патогена, который может быть отправлен в лабораторию или на автономный комплекс в виде электронного сообщения. Экспериментально продемонстрировано, что вакцина против гриппа может быть создана за 2 месяца если в качестве исходного материала была только информация о последовательности нового штамма гриппа А;

2) проводить удаленный синтез клеток бактерий для колонизации других планет в космических программах;

3) создавать животных — идеальных доноров органов для человека. После перенесения в их геном локусов генов, отвечающих за гистосовместимость;

4) проводить разработку и синтез вирусов и бактерий с заданными свойствами в террористических и военных целях.

Еще более простым, в том числе с использованием методов синтетической биологии и редактирования генома, выглядит внедрение новых патогенных свойств уже в известные биологические агенты, для многих из которых давно известны и детально описаны механизмы их патогенеза. Кроме того, и для бактерий, и для вирусов имеется множество удобных и доступных биотехнологических систем горизонтального переноса, позволяющих достаточно быстро получить микроорганизм с заданными свойствами. В настоящее время потенциальному разработчику биологического оружия нет необходимости иметь природный образец, несущий в себе нужные ему гены вирулентности. На основании открытых баз данных, воспользовавшись услугами биотехнологических фирм, разработчик может синтезировать нужный ему ген *de novo*.

Итак, в качестве создания новых патогенных организмов с помощью генно-инженерных методов наиболее простым путем является модификация уже известных организмов путем внедрения в них генов вирулентности. Наиболее привлекательными вариантами для модификации представляются: 1) внедрение в целевые биологические агенты бактериальных токсинов; 2) добавление генов устойчивости к антибиотикам; 3) повышение чувствительности иммунной системы хозяина к патогену (цитокининовый шторм); 4) синтез генов вирулентности и даже отдельных небольших патогенных организмов *de novo*.

Другой возможностью для биотерроризма является вероятность получения ими доступа к биологическим агентам, разработанным в результате военных программ государства, и коллекциям патогенных микроорганизмов. Гражданская война, восстание и беззаконие в странах, обладающих такими программами, сопровождаются значительным риском распространения БО в такой ситуации. В то же время технологические инновации и быстрое развитие наук о жизни значительно улучшили наше понимание процессов взаимодействия возбудителей с хозяином и стимулировали развитие медицинских контрмер. Кроме того, они значительно увеличили наши возможности по выявлению и идентификации патогенов. Одновременно технологические достижения, такие как сетевые видеокамеры и программное обеспечение, предназначенные для выявления важной разведывательной информации, стали мощными инструментами для борьбы с терроризмом и увеличили эффективность антитеррористических контрмер, предотвращающих

нападение. Достижения в криминалистике привели к возможности эффективно расследовать инцидент и отследить происхождение примененного биологического агента. Тем не менее опасность появления новых ПБА, в том числе несущих признаки генно-инженерной модификации, чрезвычайно высока, а их появление каждый раз представляет собой серьезный вызов для мирового сообщества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя известные литературные данные о появлении новых патогенов в том числе с участием человека, можно заключить, что снижение угрозы появления новых патогенов и патогенов с новыми биологическими свойствами возможно лишь при условии активного внедрения в практику новых средств экспресс-диагностики инфекций в ЛПУ и окружающей среде. Однако ПБА, модифицированные человеком, все же имеют признаки других, ранее описанных, организмов, что делает задачу их индикации технологически возможной. Однако особый вид угрозы представляют ранее не изученные ПБА, по каким-либо причинам спонтанно приобретающие опасные для человечества свойства. Поэтому методы их идентификации также должны быть внедрены в перспективную сеть мониторинга биологических угроз.

Обеспечение биобезопасности является важной государственной задачей. Сохранение существующего уровня негативного воздействия опасных биологических факторов, возникновение новых и возвращение отдельных ранее преодоленных рисков, угрожает санитарно-эпидемиологическому, ветеринарному, фитосанитарному и экологическому благополучию общества и ослабляет национальную безопасность в целом. В связи с этим требуется усиление готовности государства к предотвращению биогенных угроз различного происхождения.

В результате проведенного анализа литературных данных становится очевидно, что снижение угрозы появления новых ПБА (и ПБА с новыми биологическими свойствами) возможно лишь при условии активного внедрения новых средств экспресс-диагностики инфекций как в клинической практике, так и для поиска опасных ПБА в окружающей среде. Особое внимание необходимо уделить внедрению методов, направленных на поиск ранее не известных организмов, а также разработке профилактических и лечебных средств против вновь идентифицируемых патогенов.

Целью настоящего обзора являлся комплексный анализ угроз национальной безопасности через поиск уязвимостей, свойственных существующему уровню контроля за инфекционными процессами. Во-первых, эти угрозы кроются в биологических особенностях эволюции самих ПБА, которые приводят к появлению новых патогенов или их новых свойств, включая уход от вакцинации и появление антибиотикорезистентности. Во-вторых, угрозой является отсутствие или недостаточное внедрение технологий глубокого анализа и оперативного мониторинга, которым, в частности, посвящен ряд статей из настоящего номера журнала. В-третьих, уязвима сама система мониторинга биологических угроз в ее текущем состоянии вследствие межведомственной разрозненности и малой оперативности. В этой связи можно сделать вывод о необходимости скорейшего создания единого Национального интеграционного

центра мониторинга биологических угроз, собирающего и обрабатывающего информацию обо всех биологических рисках из различных источников в режиме, приближенном к режиму реального времени, обеспечивающего хранение

и анализ информации, моделирование развития ситуации, прогноз, ситуационное осведомление всех ответственных должностных лиц и выработку оптимального принятия управленческих решений на межведомственном уровне.

Литература

1. О биологической безопасности. Проект Федерального закона Российской Федерации. (ред. от августа 2016 г.). 30 с. Доступно по ссылке: <http://regulation.gov.ru/projects#pra=55658>
2. Онищенко Г. Г., Попова А. Ю., Топорков В. П., Смоленский В. Ю., Щербакова С. А., Кутырев В. В. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия. Проблемы особо опасных инфекций. 2015; (3): 5–9.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2018. 268 с.
4. Покровский В. И., Брико Н. И. Эпидемиология. Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016. 368 с.
5. Лобзин Ю. В., Белозеров Е. С., Беляева Т. В., Волжанин В. М. Вирусные болезни человека. СПб.: СпецЛит; 2015. 400 с.
6. BioWatch and public health surveillance: Evaluating systems for the early detection of biological threats. Abbreviated version. Washington, DC: The National Academies Press. IOM and NRC. 2011. 252 p.
7. Онищенко Г. Г., Меркулов И. В., Петров Е. Ю., Желобов В. Е., Шевчук Н. А., Селедцова О. В. О ходе иммунизации населения в рамках национального календаря профилактических прививок. Протокол селекторного совещания у руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол №13 от 20.07.2010). Доступно по ссылке: <http://41.rosпотребнадзор.ru/content/protokol-protokol-selektornogo-soveshchaniya-u-rukovoditelya-federalnoy-sluzhby-po-nadzoru-5>
8. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (утв. Президентом РФ 1 ноября 2013 г. N Пр-2573). Доступно по ссылке: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70423098/>
9. Указ Президента РФ от 31.12.2015 N 683 «О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации». Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_191669/
10. В России создан Центр по борьбе с биологическими угрозами. [Электронный ресурс] Paper 16 матра 2015. Available at: <https://iz.ru/news/584008> (last accessed 12 September 2018).
11. Постановление Правительства РФ от 30 июня 2004 г. N 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (в ред. от 24 января 2017 г.). Доступно по ссылке: <http://base.garant.ru/12136005/>
12. Приказ Федеральной службы государственной статистики от 28 января 2014 г. N 52 «Об утверждении статистического инструментария для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за заболеваемостью населения инфекционными и паразитарными болезнями и профилактическими прививками». Доступно по ссылке: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70479106/>
13. Статистический учет и отчетность учреждений здравоохранения. М.: Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. 2006. 81 с.
14. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (в ред. от 03.07.2016). Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_22481/
15. Постановление Правительства РФ от 2 февраля 2006 г. N 60 «Об утверждении Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга» (в ред. от 4 сентября 2012 г.). Доступно по ссылке: <http://base.garant.ru/12144791/>
16. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Утверждены главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 06 ноября 2001 г. Доступно по ссылке: <http://base.garant.ru/4178234/>
17. СанПиН 2.1.4.1074-01: Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. Утверждены главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 29 сентября 2001 г. Доступно по ссылке: <http://docs.cntd.ru/document/901798042>
18. Перечень стандартов, содержащих правила и методы испытаний и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» и осуществления оценки (подтверждения) соответствия. Приложение к Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). Утверждены Решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 года № 299. (в ред. от 09 декабря 2011 г.)
19. Dzenitis JM, Makarewicz AJ. The Autonomous Pathogen Detection System. The Microflow Cytometer. 2010: 263–84.
20. Hindson BJ, Makarewicz AJ, Setlur US, Henderer BD, McBride MT, Dzenitis JM. APDS: the autonomous pathogen detection system. Biosens Bioelectron. 2005; 20 (10): 1925–31.
21. Онищенко Г. Г., Кузькин Б. П., Демина Ю. В. и др. Обеспечение готовности и организации работы СПЭБ ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи. Проблемы особо опасных инфекций. 2015; (1): 58–62.
22. GAO-14-267T BIOSURVEILLANCE: Observations on the Cancellation of BioWatch Gen-3 and Future Considerations for the Program. GAO. Statement of Chris Currie, Acting Director, Homeland Security and Justice. Washington, D.C.: 2014.
23. Fournier PE, Raoult D. Prospects for the future using genomics and proteomics in clinical microbiology. Annu Rev Microbiol. 2011; (65): 169–188.
24. Diene SM, Bertelli C, Pillonel T, Schrenzel J, Greub G. Bacterial genomics and metagenomics: clinical applications and medical relevance. Rev Med Suisse. 2014; 10 (450): 2155–61.
25. Zhou K, Ferdous M, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Grundmann H, Friedrich AW, et al. The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4

- is driven by short-term adaptation. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (468): e467–18.
26. Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, Tepper M, Arends JP, Raangs EG, et al. Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum beta-lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep.* 2016; (6): 20840.
 27. Weterings V, Zhou K, Rossen JW, van Stenis D, Thewissen E, Kluytmans J, et al. An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July–December 2013), with inter-institutional spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; (34): 1647–55.
 28. Ferdous M, Zhou K, de Boer RF, Friedrich AW, Kooistra-Smid AM, Rossen JW, Comprehensive characterization of *Escherichia coli* O104:H4 isolated from patients in the Netherlands. *Front Microbiol.* 2015; (6): 1348.
 29. Bathoorn E, Rossen JW, Lokate M, Friedrich AW, Hammerum AM. Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without travel history abroad, August 2015. *Euro Surveill.* 2015; (20): 30040.
 30. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Kasbohrer A, Chakraborty T. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis.* 2016; (16): 282–283.
 31. Aanensen DM, Feil EJ, Holden MT, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A, et al. Whole-genome sequencing for routine pathogen surveillance in public health: a population snapshot of invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. *Mbio.* 2016; 7 (3): e00444–16.
 32. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Med.* 2014; (6): 114.
 33. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014; (52): 139–46.
 34. Franz E, Delaquis P, Morabito S, Beutin L, Gobius K, Rasko DA, et al. Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. *Int J Food Microbiol.* 2014; (187): 57–72.
 35. Laabei M, Recker M, Rudkin JK, Aldelawi M, Gulay Z, Sloan TJ, et al. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome Res.* 2014; (24): 839–49.
 36. Ferdous M, Friedrich AW, Grundmann H, de Boer RF, Croughs PD, Islam MA, et al. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect* 2016; (22): 642.e1–642.e9.
 37. Nijhuis RH, Oueslati S, Zhou K, Bosboom RW, Rossen JW, Naas T, et al. OXY-2-15, a novel variant showing increased ceftazidime hydrolytic activity. *J Antimicrob Chemother.* 2015; (70): 1429–33.
 38. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2014; (52): 139–46.
 39. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 2001; (6): 313–21.
 40. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol.* 2004; (42): 734–40.
 41. Srinivasan L, Pisapia JM, Shah SS, Halpern CH, Harris MC. Can broad-range 16S ribosomal ribonucleic acid gene polymerase chain reactions improve the diagnosis of bacterial meningitis? A systematic review and meta-analysis. *Ann Emerg Med.* 2012; (60): 609–20.
 42. Kalia VC, Kumar R, Kumar P, Koul S. A genome-wide profiling strategy as an aid for searching unique identification biomarkers for *Streptococcus*. *Indian J Microbiol.* 2016; (56): 46–58.
 43. Sabat AJ, van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, van Slochteren K, de Boer RF. Targeted amplification for bacterial identification at the species-level using next-generation sequencing—increased discrimination of closely related species. *ECCMID.* 2016; E-poster EP0219.
 44. Daubin V, Gouy M, Perriere G. Bacterial molecular phylogeny using supertree approach. *Genome Inform.* 2001; (12): 155–64.
 45. Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genom.* 2013; (14): 913.
 46. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; (18): 426–39.
 47. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013; (18): 20380.
 48. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med.* 2013; (5): 509–15.
 49. Макаров В. В., Хромов А. В., Гушин В. А., Ткачук А. П. Возникновение новых инфекций в 21 веке и способы их идентификации с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS). *Вестник РГМУ.* 2017; (1): 5–25.
 50. Яковлев С. В., Суворова М. П., Белобородов В. Б., Басин Е. Е., Елисеева Е. В., Коваленко С. В. и др. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. *Антибиотики и химиотерапия* 2016; 61 (5–6): 32–42.
 51. Козлов Р. С. Пневмококки: уроки прошлого — взгляд в будущее. Смоленск: МАКМАХ; 2010.
 52. Paterson DL, Rossi F, Baquero F, et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patient with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trend (SMART). *J Antimicrob Chemother.* 2005; (55): 965–73.
 53. Научный отчет о результатах исследования антибиотикорезистентности бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях с интенсивным использованием антибиотиков в стационарах России (РеваНШ). Смоленск: Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии; 2009.
 54. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2017 Oct 16.
 55. Kohler PP, Volling C, Green K, Ulerik EM, Shah PS, McGeer A. Carbapenem Resistance, Initial Antibiotic Therapy, and Mortality in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017 Nov; 38 (11): 1319–28.
 56. Zavascki AP, Barth AL, Gaspareto PB, et al. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006; (58): 882–5.
 57. Messadi AA, Lamia T, Kamel B, et al. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *P. aeruginosa* in an intensive care unit: a 5-year study, 2000–2004. *Burns.* 2008; (34): 1098–102.
 58. Яковлев С. В., Проценко Д. Н., Шахова Т. В. и др. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? *Антибиотики и химиотерапия.* 2010; 55 (1–2): 50–58.
 59. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2008; (61):

- 26–38.
60. Sarma JB, Ahmed GU. Characterisation of methicillin resistant *S. aureus* strains and risk factors for acquisition in a teaching hospital in northeast India. *Indian J Med Microbiol.* 2010; (28): 127–9.
 61. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Med Chem.* 2014; (6): 25–64.
 62. Curcio D. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: are you ready for the challenge? *Curr Clin Pharmacol.* 2014; (9): 27–38.
 63. De Angelis GD, D'Inzeo T, Fiori B, et al. Burden of antibiotic resistant Gram-negative bacterial infections: evidence and limits. *J Med Microbiol Diagn.* 2014; (3): 132–37.
 64. Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. ВОЗ. 2016 г. 7 с. Доступно по ссылке: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_24-ru.pdf
 65. Яковлев С. В., Проценко Д. Н., Шахова Т. В. и др. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? Антибиотики и химиотерапия. 2010; 55 (1–2): 50–8.
 66. Яковлев С. В., Сидоренко С. В., Рафальский В. В., Спичак Т. В., редакторы. Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике. Российские практические рекомендации. М.: Издательство «Пре100принт»; 2014. 121 с.
 67. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015; (13): 42–51.
 68. The Protocol for the Prohibition of the Use in War of Asphyxiating, Poisonous or Other Gases, and of Bacteriological Methods of Warfare. United Nations (1925). Available from: <http://www.un.org/disarmament/WMD/Bio/1925GenevaProtocol.shtml> (last accessed 12 December 2015).
 69. World Health Organization. Public health response to biological and chemical weapons — WHO guidance, 2nd edn. Geneva: WHO, 2004.
 70. Nuclear Threat Initiative. Available from: <http://www.nti.org/country-profiles> (last accessed 12 December 2015).
 71. Atlas RM. The medical threat of biological weapons. *Crit Rev Microbiol.* 1998; (24): 157–68.
 72. Leitenberg M, Zilinskas RA, editors. The Soviet biological weapons program: a history. Cambridge, MA: Harvard University Press; 2012.
 73. Centers for Disease Control and Prevention. Webpage Emergency Preparedness and Response. Specific hazards: Bioterrorism. Available from: <http://www.bt.cdc.gov/bioterrorism> (last accessed 12 December 2015).
 74. Carus WS. Bioterrorism and biocrimes: the illicit use of biological agents since 1900. February 2001 revision. Washington, DC: Center for Counterproliferation Research, National Defense University. 2001. Available from: <http://www.fas.org/irp/threat/cbw/carus.pdf> (last accessed 12 December 2015).
 75. Ackermann GA, Moran KS. Bioterrorism and threat assessment. Weapons of Mass Destruction Commission. 2004. Available from: www.blixassociates.com/wp-content/uploads/2011/03/No22.pdf (last accessed 12 December 2015).
 76. Dando M. Bioterrorism: what is the real threat? Science and Technology Report No. 3. UK Global Health Policy Programme. London: The Nuffield Trust, 2005.
 77. Kolavic SA, Kimura A, Simons SL, et al. An outbreak of *Shigella dysenteriae* Type 2 among laboratory workers due to intentional food contamination. *JAMA.* 1997; (278): 396–8.
 78. Wheelis M, Casagrande R, Madden LV. Biological attack on agriculture: low-tech, high-impact bioterrorism. *Bioscience.* 2002; (52): 569–76.
 79. Bourn J. The 2001 Outbreak of Foot and Mouth Disease. Report by the Comptroller and Auditor General, HC 939 Session 2001–2002. London, UK, National Audit Office. 2002. Available from: www.nao.gov.uk (last accessed 12 December 2015).
 80. Meuwissen MPM, Van Boven M, Hagenaars TJ, et al. Predicting future costs of high-pathogenicity avian influenza epidemics: large versus small uncertainties. *NJAS.* 2006; (52): 195–205.
 81. Schmitt K, Zacchia NA. Total decontamination cost of the anthrax letter attacks. *Biosecur Bioterror.* 2012; (10): 1–10.
 82. Gibson DG1, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science.* 2010 Jul 2; 329 (5987): 52–6. DOI: 10.1126/science.1190719.
 83. Gibson DG, Venter JC. Synthetic biology: Construction of a yeast chromosome. *Nature.* 2014 May 8; 509 (7499): 168–9. DOI: 10.1038/509168a.
 84. Hutchison CA, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science.* 2016 Mar 25; 351 (6280): aad6253. DOI: 10.1126/science.aad6253.
 85. Boles KS, Kannan K, Gill J, Felderman M, Gouvris H, Hubby B, et al. Digital-to-biological converter for on-demand production of biologics. *Nature Biotechnology.* 2017; (35): 672–5.

References

1. О биологической безопасности. Проект Федерального закона Российской Федерации. (ред. от августа 2016 г.). 30 с. Доступно по ссылке: <http://regulation.gov.ru/projects#npa=55658>
2. Onishchenko GG, Popova AJu, Toporkov VP, Smolenskii VJu, Shcherbakova SA, Kutuyev VV. Sovremennye ugrozy i vyzovy v oblasti biologicheskoy bezopasnosti i strategiya protivodeystviya. Problemy osobo opasnykh infekcij. 2015; (3): 5–9.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2018. 268 с.
4. Pokrovskij VI, Briko NI. Jepidemiologija. Uchebnik. M.: GJeOTAR-Media; 2016. 368 s.
5. Lobzin JuV, Belozorov ES, Beljaeva TV, Volzhanin VM. Virusnye bolezni cheloveka. SPb.: SpecLit; 2015. 400 s.
6. BioWatch and public health surveillance: Evaluating systems for the early detection of biological threats. Abbreviated version. Washington, DC: The National Academies Press. IOM and NRC. 2011. 252 p.
7. Onishchenko GG, Merkulov IV, Petrov EJu, Zhelobov VE, Shevchuk NA, Seledcova OV. О ходе иммунизации населения в рамках национальной календаря профилактических прививок. Протокол селективного совещания у руководителей Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол #13 от 20.07.2010). Доступно по ссылке: <http://41.rospotrebnadzor.ru/content/protokol-protokol-selektornogo-soveshchaniya-urukovoditelya-federalnoy-služby-po-nadzoru-5>
8. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (утв. Президентом РФ 1 ноября 2013 г. N Pr-2573). Доступно по ссылке: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70423098/>
9. Ukaz Президента РФ от 31.12.2015 N 683 «О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации». Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_191669/
10. В России создан Центр по борьбе с биологическими угрозами. [Электронный ресурс] Paper 16 марта 2015. Доступно по ссылке: <https://iz.ru/news/584008> (last accessed 12 September 2018).
11. Постановление Правительства РФ от 30 июня 2004 г. N 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в

- сфере зашхиты прав potrebitelej i blagopoluchija cheloveka» (v red. ot 24 janvarja 2017 g.). Dostupno po ssylke: <http://base.garant.ru/12136005/>
12. Prikaz Federal'noj sluzhby gosudarstvennoj statistiki ot 28 janvarja 2014 g. N 52 «Ob utverzhdenii statisticheskogo instrumentarija dlja organizacii Federal'noj sluzhboj po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka federal'nogo statisticheskogo nabljudenija za zaboлеваemost'ju naselenija infekcionnymi i parazitarnymi boleznyami i profilakticheskimi privivkami». Dostupno po ssylke: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70479106/>
 13. Statisticheskij uchet i otchetnost' uchrezhdenij zdrazvoohranenija. M.: Ministerstvo zdrazvoohranenija i social'nogo razvitija Rossijskoj Federacii. 2006. 81 s.
 14. Federal'nyj zakon ot 30.03.1999 N 52-FZ «O sanitarno-jepidemiologicheskomo blagopoluchii naselenija» (v red. ot 03.07.2016). Dostupno po ssylke: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_22481/
 15. 15. Postanovlenie Pravitel'stva RF ot 2 fevralja 2006 g. N 60 «Ob utverzhdenii Polozhenija o provedenii social'no-gigienicheskogo monitoringa» (v red. ot 4 sentjabrja 2012 g.). Dostupno po ssylke: <http://base.garant.ru/12144791/>
 16. SanPiN 2.3.2.1078-01. Gigienicheskie trebovanija bezopasnosti i pishhevoj cennosti pishhevych produktov. Utverzhdeny glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii 06 nojabrja 2001 g. Dostupno po ssylke: <http://base.garant.ru/4178234/>
 17. SanPiN 2.1.4.1074-01: Pit'evaja voda. Gigienicheskie trebovanija k kachestvu vody centralizovannyh sistem pit'evogo vodosnabzhenija. Kontrol' kachestva. Gigienicheskie trebovanija k obespecheniju bezopasnosti sistem gorjachego vodosnabzhenija. Utverzhdeny glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossijskoj Federacii 29 sentjabrja 2001 g. Dostupno po ssylke: <http://docs.cntd.ru/document/901798042>
 18. Perechen' standartov, sodержashhih pravila i metody ispytaniy i izmerenij, v tom chisle pravila otbora obrazcov, neobhodimye dlja primenenija i ispolnenija trebovanij tehnicheskogo reglamenta Tamozhennogo sojuza «Trebovanija bezopasnosti pishhevych dobavok, aromatizatorov i tehnologicheskikh vspomogatel'nyh sredstv» i osushhestvlenija ocenki (podtverzhdenija) sootvetstvija. Prilozhenie k Edinyim sanitarno-jepidemiologicheskim i igienicheskim trebovanijam k tovaram, podlezhashhim sanitarno-jepidemiologicheskomo nadzoru (kontrollu). Utverzhdeny Resheniem Komissii Tamozhennogo sojuza ot 28 maja 2010 goda # 299. (v red. ot 09 dekabrja 2011 g.)
 19. Dzenitis JM, Makarewicz AJ. The Autonomous Pathogen Detection System. The Microflow Cytometer. 2010: 263–84.
 20. Hindson BJ, Makarewicz AJ, Setlur US, Henderer BD, McBride MT, Dzenitis JM. APDS: the autonomous pathogen detection system. Biosens Bioelectron. 2005; 20 (10): 1925–31.
 21. Onishhenko GG, Kuzkin BP, Demina JuV. i dr. Obespechenie gotovnosti i organizacija raboty SPJeB FKUZ «Stavropol'skij protivochumnyj institut» Rospotrebnadzora v period provedenija XXII Olimpijskih i XI Paralimpijskih zimnih igr v Sochi. Problemy osobo opasnyh infekcij. 2015; (1): 58–62.
 22. GAO-14-267T BIOSURVEILLANCE: Observations on the Cancellation of BioWatch Gen-3 and Future Considerations for the Program. GAO. Statement of Chris Currie, Acting Director, Homeland Security and Justice. Washington, D.C.: 2014.
 23. Fournier PE, Raoult D. Prospects for the future using genomics and proteomics in clinical microbiology. Annu Rev Microbiol. 2011; (65): 169–188.
 24. Diene SM, Bertelli C, Pilonel T, Schrenzel J, Greub G. Bacterial genomics and metagenomics: clinical applications and medical relevance. Rev Med Suisse. 2014; 10 (450): 2155–61.
 25. Zhou K, Ferdous M, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Grundmann H, Friedrich AW, et al. The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 is driven by short-term adaptation. Clin Microbiol Infect. 2015; 21 (468): e467–18.
 26. Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, Tepper M, Arends JP, Raangs EG, et al. Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum beta-lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep. 2016; (6): 20840.
 27. Weterings V, Zhou K, Rossen JW, van Stenis D, Thewessen E, Kluytmans J, et al. An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July–December 2013), with inter-institutional spread. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; (34): 1647–55.
 28. Ferdous M, Zhou K, de Boer RF, Friedrich AW, Kooistra-Smid AM, Rossen JW, Comprehensive characterization of *Escherichia coli* O104:H4 isolated from patients in the Netherlands. Front Microbiol. 2015; (6): 1348.
 29. Bathoorn E, Rossen JW, Lokate M, Friedrich AW, Hammerum AM. Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without travel history abroad, August 2015. Euro Surveill. 2015; (20): 30040.
 30. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Kasbohrer A, Chakraborty T. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. Lancet Infect Dis. 2016; (16): 282–283.
 31. Aanensen DM, Feil EJ, Holden MT, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A, et al. Whole-genome sequencing for routine pathogen surveillance in public health: a population snapshot of invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. Mbio. 2016; 7 (3): e00444–16.
 32. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. Genome Med. 2014; (6): 114.
 33. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. J Clin Microbiol. 2014; (52): 139–46.
 34. Franz E, Delaquis P, Morabito S, Beutin L, Gobius K, Rasko DA, et al. Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. Int J Food Microbiol. 2014; (187): 57–72.
 35. Laabei M, Recker M, Ruckin JK, Aldehawi M, Gulay Z, Sloan TJ, et al. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. Genome Res. 2014; (24): 839–49.
 36. Ferdous M, Friedrich AW, Grundmann H, de Boer RF, Croughs PD, Islam MA, et al. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. Clin Microbiol Infect. 2016; (22): 642.e1–642.e9.
 37. Nijhuis RH, Oueslati S, Zhou K, Bosboom RW, Rossen JW, Naas T, et al. OXY-2-15, a novel variant showing increased ceftazidime hydrolytic activity. J Antimicrob Chemother. 2015; (70): 1429–33.
 38. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. J Clin Microbiol. 2014; (52): 139–46.
 39. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn. 2001; (6): 313–21.
 40. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J Clin Microbiol. 2004; (42): 734–40.
 41. Srinivasan L, Pisapia JM, Shah SS, Halpern CH, Harris MC. Can broad-range 16S ribosomal ribonucleic acid gene polymerase chain reactions improve the diagnosis of bacterial meningitis? A systematic review and meta-analysis. Ann Emerg Med. 2012; (60): 609–20.
 42. Kalia VC, Kumar R, Kumar P, Koul S. A genome-wide profiling strategy as an aid for searching unique identification biomarkers for *Streptococcus*. Indian J Microbiol. 2016; (56): 46–58.
 43. Sabat AJ, van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, van Slochteren K, de Boer RF. Targeted amplification for

- bacterial identification at the species-level using next-generation sequencing—increased discrimination of closely related species. *ECCMID*. 2016; E-poster EP0219.
44. Daubin V, Gouy M, Perriere G. Bacterial molecular phylogeny using supertree approach. *Genome Inform*. 2001; (12): 155–64.
 45. Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genom*. 2013; (14): 913.
 46. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997; (18): 426–39.
 47. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013; (18): 20380.
 48. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med*. 2013; (5): 509–15.
 49. Makarov VV, Hromov AV, Gushin VA, Tkachuk AP. Voznikovenie novykh infekcij v 21 veke i sposoby ih identifikacii s ispol'zovaniem vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovaniya (NGS). *Vestnik RGMU*. 2017; (1): 5–25.
 50. Jakovlev SV, Suvorova MP, Beloborodov VB, Basin EE, Eliseeva EV, Kovelonov SV, i dr. Rasprostranennost' i klinicheskoe znachenie nozokomial'nykh infekcij v lechebnykh uchrezhdenijah Rossii: issledovanie JeRGINI. *Antibiotiki i himioterapija* 2016; 61 (5–6): 32–42.
 51. Kozlov RS. *Pnevmonokki: uroki proshlogo — vzgljad v budushhee*. Smolensk: MAKMAH; 2010.
 52. Paterson DL, Rossi F, Baquero F, et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patient with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trend (SMART). *J Antimicrob Chemother*. 2005; (55): 965–73.
 53. Nauchnyj otchet o rezul'tatah issledovaniya antibiotikorezistentnosti bakterial'nykh vzbuditelej nozokomial'nykh infekcij v otdelenijah s intensivnym ispol'zovaniem antibiotikov v stacionarah Rossii (ReVANSh). Smolensk: Nauchno-issledovatel'skij institut antimikrobnj himioterapii; 2009.
 54. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis*. 2017 Oct 16.
 55. Kohler PP, Volling C, Green K, Uleryk EM, Shah PS, McGeer A. Carbapenem Resistance, Initial Antibiotic Therapy, and Mortality in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017 Nov; 38 (11): 1319–28.
 56. Zavascki AP, Barth AL, Gaspareto PB, et al. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2006; (58): 882–5.
 57. Messadi AA, Lamia T, Kamel B, et al. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *P. aeruginosa* in an intensive care unit: a 5-year study, 2000–2004. *Burns*. 2008; (34): 1098–102.
 58. Jakovlev SV, Procenko DN, Shahova TV, i dr. Antibiotikorezistentnost' v stacionare: kontroliruem li my situaciju? *Antibiotiki i himioterapija*. 2010; 55 (1–2): 50–58.
 59. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2008; (61): 26–38.
 60. Sarma JB, Ahmed GU. Characterisation of methicillin resistant *S. aureus* strains and risk factors for acquisition in a teaching hospital in northeast India. *Indian J Med Microbiol*. 2010; (28): 127–9.
 61. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Med Chem*. 2014; (6): 25–64.
 62. Curcio D. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: are you ready for the challenge? *Curr Clin Pharmacol*. 2014; (9): 27–38.
 63. De Angelis GD, D'Inzeo T, Fiori B, et al. Burden of antibiotic resistant Gram-negative bacterial infections: evidence and limits. *J Med Microbiol Diagn*. 2014; (3): 132–37.
 64. Global'nyj plan dejstv'ij po bor'be s ustojchivost'ju k protivomikrobnym preparatam. VOZ. 2016 g. 7 s. Dostupno po ssylke: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_24-ru.pdf
 65. Jakovlev SV, Procenko DN, Shahova TV, i dr. Antibiotikorezistentnost' v stacionare: kontroliruem li my situaciju? *Antibiotiki i himioterapija*. 2010; 55 (1–2): 50–8.
 66. Jakovlev SV, Sidorenko SV, Rafal'skij VV, Spichak TV, redaktory. Strategija i taktika racional'nogo primeneniya antimikrobnjkh sredstv v ambulatornoj praktike. Rossijskie prakticheskie rekomendacii. M.: Izdatel'stvo «Pre100print»; 2014. 121 s.
 67. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015; (13): 42–51.
 68. The Protocol for the Prohibition of the Use in War of Asphyxiating, Poisonous or Other Gases, and of Bacteriological Methods of Warfare. United Nations (1925). Available from: <http://www.un.org/disarmament/WMD/Bio/1925GenevaProtocol.shtml> (last accessed 12 December 2015).
 69. World Health Organization. Public health response to biological and chemical weapons — WHO guidance, 2nd edn. Geneva: WHO, 2004.
 70. Nuclear Threat Initiative. Available from: <http://www.nti.org/country-profiles> (last accessed 12 December 2015).
 71. Atlas RM. The medical threat of biological weapons. *Crit Rev Microbiol*. 1998; (24): 157–68.
 72. Leitenberg M, Zilinskas RA, editors. The Soviet biological weapons program: a history. Cambridge, MA: Harvard University Press; 2012.
 73. Centers for Disease Control and Prevention. Webpage Emergency Preparedness and Response. Specific hazards: Bioterrorism. Available from: <http://www.bt.cdc.gov/bioterrorism> (last accessed 12 December 2015).
 74. Carus WS. Bioterrorism and biocrimes: the illicit use of biological agents since 1900. February 2001 revision. Washington, DC: Center for Counterproliferation Research, National Defense University. 2001. Available from: <http://www.fas.org/irp/threat/cbw/carus.pdf> (last accessed 12 December 2015).
 75. Ackermann GA, Moran KS. Bioterrorism and threat assessment. Weapons of Mass Destruction Commission. 2004. Available from: www.blixassociates.com/wp-content/uploads/2011/03/No22.pdf (last accessed 12 December 2015).
 76. Dando M. Bioterrorism: what is the real threat? Science and Technology Report No. 3. UK Global Health Policy Programme. London: The Nuffield Trust, 2005.
 77. Kolavic SA, Kimura A, Simons SL, et al. An outbreak of *Shigella dysenteriae* Type 2 among laboratory workers due to intentional food contamination. *JAMA*. 1997; (278): 396–8.
 78. Wheelis M, Casagrande R, Madden LV. Biological attack on agriculture: low-tech, high-impact bioterrorism. *Bioscience*. 2002; (52): 569–76.
 79. Bourn J. The 2001 Outbreak of Foot and Mouth Disease. Report by the Comptroller and Auditor General, HC 939 Session 2001–2002. London, UK, National Audit Office. 2002. Available from: www.nao.gov.uk (last accessed 12 December 2015).
 80. Meuwissen MPM, Van Boven M, Hagenaars TJ, et al. Predicting future costs of high-pathogenicity avian influenza epidemics: large versus small uncertainties. *NJAS*. 2006; (52): 195–205.
 81. Schmitt K, Zaccchia NA. Total decontamination cost of the anthrax letter attacks. *Biosecur Bioterror*. 2012; (10): 1–10.
 82. Gibson DG1, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010 Jul 2; 329 (5987): 52–6. DOI: 10.1126/science.1190719.
 83. Gibson DG, Venter JC. Synthetic biology: Construction of a

- yeast chromosome. *Nature*. 2014 May 8; 509 (7499): 168–9. DOI: 10.1038/509168a.
84. Hutchison CA, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 2016 Mar 25; 351 (6280): aad6253. DOI: 10.1126/science.aad6253.
85. Boles KS, Kannan K, Gill J, Felderman M, Gouvis H, Hubby B, et al. Digital-to-biological converter for on-demand production of biologics. *Nature Biotechnology*. 2017; (35): 672–5

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОБСЕМЕНЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЙ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОЛН В ФОТОННЫХ КРИСТАЛЛАХ

И. О. Петрова¹, В. Н. Конопский², А. В. Суханова¹, И. Р. Набиев¹ ✉

¹ Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва

² Лаборатория спектроскопии конденсированных сред, Институт спектроскопии РАН, Троицк

Традиционные методы оценки качества продуктов питания, воды и других сред имеют ряд недостатков. Предлагается безметочный высокоточный аналитический метод многопараметрической детекции биомаркеров, основанный на анализе изменений параметров распространения поверхностных волн на поверхности фотонного кристалла (ПВФК). Метод позволяет проводить измерения молекулярных и клеточных аффинных взаимодействий в реальном времени путем независимой регистрации величин угла полного внутреннего отражения и угла возбуждения поверхностной волны на поверхности фотонного кристалла. На основании метода анализа ПВФК разработан протокол детекции экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* и термолабильного токсина LT *Escherichia coli*. Протокол основан на детекции в реальном времени аффинного взаимодействия между антигенами, раствор которых прокачивается через микрофлюидную ячейку, и специфическими распознающими антителами, конъюгированными с химически активированной кремниевой подложкой каналов поверхности ФК. Показано, что метод ПВФК отличается более высокой чувствительностью, а также уменьшенным временем проведения анализа и сниженной материалозатратностью, по сравнению с методом поверхностного плазмонного резонанса.

Ключевые слова: фотонные кристаллы, поверхностные волны, бактериальные токсины, детекция в реальном времени

Финансирование: исследование поддержано Министерством здравоохранения Российской Федерации, в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)», государственный контракт № К-27-НИР/144-5 от 24.12.2015 г.

Благодарности: авторы благодарны заведующему лабораторией трансляционной биомедицины ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России А. П. Ткачуку за предоставление кроличьих антител против термолабильного токсина LT.

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Руфаилович Набиев
Каширское шоссе, д. 31, г. Москва, 115529; igor.nabiev@gmail.com

Статья получена: 28.07.2018 **Статья принята к печати:** 20.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.047

MULTIPARAMETRIC DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION BASED ON THE PHOTONIC CRYSTAL SURFACE MODE DETECTION

Petrova IO¹, Konopsky VN², Sukhanova AV¹, Nabiev IR¹ ✉

¹ Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow

² Laboratory of Spectroscopy of Condensed Matter, Institute for Spectroscopy, Russian Academy of Sciences, Troitsk

Conventional techniques for food and water quality control and environmental monitoring in general have a number of drawbacks. Below we propose a label-free highly accurate analytical technique for multiplex detection of biomarkers based on the analysis of propagation of Bloch waves on the surface of a photonic crystal. The technique can be used to measure molecular and cell affinity interactions in real time by recording critical and excitation angles of the surface wave on the surface of a photonic crystal. Based on the analysis of photonic crystal surface modes, we elaborated a protocol for the detection of the exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* and the heat-labile toxin LT of *Escherichia coli*. The protocol exploits detection of affinity interactions between antigens pumped through a microfluidic cell and detector antibodies conjugated to the chemically activated silica chip. The proposed technique is highly sensitive, cheap and less time-consuming in comparison with surface plasmon resonance.

Keywords: photonic crystals, surface modes, bacterial toxins, real-time detection

Funding: this work was part of the Federal Targeted Program *The National system of Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015-2020)* supported by the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (State grant No. K-27-НИР/144-5 dated December 24, 2015).

Acknowledgement: the authors wish to thank Tkachuk AP, Head of the Department of Translational Biomedicine (Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology) for rabbit antibodies against the heat-labile toxin LT.

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor R. Nabiev
Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115529; igor.nabiev@gmail.com

Received: 28.07.2018 **Accepted:** 20.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.047

Детекция бактериального обсеменения и токсинов, вырабатываемых патогенной флорой, в жидкой пробе чрезвычайно важна для оценки качества пищевых продуктов, воды и других сред. Общеизвестным методом детекции патогенов является полимеразная цепная реакция

(ПЦР), которая, обладая высокой чувствительностью, представляет собой довольно длительную, трудоемкую и материалоемкую процедуру. Кроме того, зачастую важно определение в пробе не самих бактериальных клеток, а их метаболитов, в частности токсинов белковой

природы, являющихся основным фактором патогенности. Поскольку с помощью ПЦР проводят детекцию нуклеиновых кислот, данный метод неприменим как для детекции бактериальных токсинов, так и для обнаружения некоторых специфических патогенов, например прионов.

В настоящее время используют классические методы детекции белков (в частности, токсинов) в жидкой пробе. Традиционные подходы, такие как вестерн-блот и иммунофлуоресцентный анализ (ИФА), сравнительно просты и имеют невысокую стоимость, но обладают низкой производительностью и требуют длительного времени. Они подходят для клинико-диагностических работ, но после дополнительной подготовки образца и использования ферментативных или флуоресцентных меток для амплификации специфического сигнала, что увеличивает материальные затраты и трудоемкость анализа.

Кроме того, разрабатываются более современные методы детекции, включающие электрохимический иммуноанализ [1–2], хемилюминесцентную визуализацию [3], флуоресцентную детекцию в потоке с помощью активированных микросфер из диоксида кремния [4] и электрохимический анализ на основе полимерных псевдоантител [5]. Важным преимуществом этих методов является многопараметричность анализа, т. е. возможность одновременной детекции различных аналитов в одном образце. В отличие от традиционных методов, данные подходы высокопроизводительны, но дорогостоящи и сложны в интерпретации, что делает их неподходящими для рутинной практики. Большая часть этих методов требует использования дополнительных меток, за исключением безметочного электрохимического анализа — чувствительного и элегантного подхода, который, однако, неприменим для многопараметрического исследования [6].

Чрезвычайно перспективен метод детекции с помощью поверхностного плазмонного резонанса [7], основанный на возбуждении падающим светом поверхностных плазмон-поляритонов на границе раздела «металл–диэлектрик». Этот чувствительный быстрый и безметочный метод не требует сложной предварительной подготовки образца. Антитела, специфичные к целевому белку, конъюгируются с поверхностью тонкой золотой пленки, и массоперенос, связанный со взаимодействием этих антител с растворимым антигеном, присутствующим в жидкой пробе, регистрируется как изменение показателя преломления поверхностного слоя жидкости вблизи поверхности золотой пленки.

I. Дизайн эксперимента

В настоящей работе предложен новый подход к выявлению бактериального обсеменения, основанный на детекции поверхностных волн на фотонном кристалле (ПВФК). ФК представляет собой материал, характеризующийся периодической модуляцией показателей преломления (ПП) в масштабе длины световой волны. Такие структуры поддерживают дальнедействующее распространение поверхностных оптических волн вдоль своей внешней поверхности. ПВФК используют в многочисленных оптических сенсорах [8–10]. Есть данные о том, что сенсоры, основанные на ПВФК, превосходят по чувствительности сенсоры на основе принципа поверхностного плазмонного резонанса [9]. С использованием ПВФК возможна детекция обоих видов поляризации (параллельной и перпендикулярной) световой волны, позволяющая регистрировать отдельно толщину поверхностного слоя и показатель преломления

жидкой фазы, так что результат изменения параметров отраженного сигнала несет в себе информацию о факте взаимодействия (массопереноса) растворимого аналита с функционализированной поверхностью ФК вне зависимости от изменений показателя преломления вблизи этой поверхности.

Кроме того, важным преимуществом метода детекции с использованием ПВФК является возможность простой регенерации поверхности используемых подложек плазменной очисткой и последующей активации и конъюгации с новым распознающим белком. Эта возможность позволяет использовать одну и ту же подложку ФК бесконечное количество раз, а также готовить заранее активированные подложки ФК для конкретного эксперимента.

В настоящей работе проведено исследование взаимодействия полимерных микросфер, покрытых слоем полиэлектролита (отрицательно заряженной поли(акриловой) кислоты), с поверхностью ПВФК-биосенсора, покрытой положительно заряженным поли(4-стиренсульфонатом) натрия. Поскольку микросферы диаметром 4,08 мкм можно рассматривать как модель бактериальной клетки, проведенные эксперименты демонстрируют принципиальную возможность детекции бактериальных клеток в жидкой пробе с помощью ПВФК-биосенсора.

Кроме этого, показана возможность детекции с помощью ПВФК-биосенсора бактериальных токсинов в жидкой пробе. В качестве объектов для количественного анализа были выбраны экзотоксин А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и термолабильный токсин LT бактерии *Escherichia coli*.

Рассмотрим подробнее основные этапы разработки аналитического метода многопараметрической детекции биомаркеров и его использование для определения бактериальных токсинов.

II. Подготовительные этапы

1. Реагенты

В работе использовали следующие реагенты: хлорид натрия, > 99% (Sigma-Aldrich, S6191; США); этанол, 99,5% (Acros Organics, AC615090010; Бельгия); ацетон для ВЖХ, 99,8% (Acros Organics, 268310010; Бельгия); (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС), 99% (Sigma-Aldrich, 440140; США); глутаровый альдегид, grade I, 25% в H₂O (Sigma-Aldrich, G5882; США); натрия фосфат двухосновный гептагидрат, 98–102% (Sigma-Aldrich, S9390; США); натрия фосфат одноосновный моногидрат, ≥ 98% (Sigma-Aldrich, S9638; США); фосфатно-солевой буфер (PBS) в таблетках (Sigma-Aldrich, P4417; США); белок А, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard (Sigma-Aldrich, 1578805; США); поли(4-стиренсульфонат) натрия (PSS), средняя мол. масса 70 000 (Sigma-Aldrich, 243051; США); поли(аллиламин)гидрохлорид (ПАН), средняя мол. масса 50 000 (Sigma-Aldrich, 283223; США); поли(акриловая) кислота (PAA), средняя мол. масса 130000 (Sigma-Aldrich, 181293; США); антитело против экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, кроличье, цельная антисыворотка (Sigma-Aldrich, P2318; США); экзотоксин А бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, лиофилизированный порошок (Sigma-Aldrich, P0184; США); термолабильный токсин LT бактерии *Escherichia coli*, субъединица В, рекомбинантный, > 90%, лиофилизированный порошок (Sigma-Aldrich, E8656; США); бычий сывороточный альбумин (BSA), лиофилизированный

порошок, кристаллический, $\geq 98,0\%$ (GE) (Sigma-Aldrich, 05470; США).

Кроличьи антитела против термолabileного токсина LT были любезно предоставлены заведующим лабораторией трансляционной биомедицины ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, А. П. Ткачуком.

2. Биосенсор на основе детекции поверхностных волн в фотонном кристалле

В работе использовали ПВФК-биосенсор EVA 2.0 [10]. В биосенсоре использовали следующую структуру одномерного ФК: субстрат/(LH)₃L'/вода, где L — слой SiO₂ толщиной $d_1 = 186,4$ нм, H — слой Ta₂O₅ с толщиной $d_2 = 115,2$ нм и L' — слой SiO₂ с толщиной $d_3 = 776,8$ нм.

Семислойную структуру (начинающуюся и заканчивающуюся слоями SiO₂) создавали методом магнетронного напыления. Призма и стеклянная пластина были изготовлены из стекла BK-7. Показатели преломления субстрата, SiO₂, Ta₂O₅ и воды при $\lambda = 632,8$ нм составляли $n_0 = 1,515$; $n_1 = n_3 = 1,47$; $n_2 = 2,07$ и $n_5 = 1,332$ соответственно.

Данные, полученные с использованием биосенсора, обрабатывали в программе Origin 8.1 (OriginLab; США).

3. Микросферы

Латексные микросферы диаметром 4,08 мкм (MF-COOH-AR421 Carboxyl-modified Melamine Resin-Research Particles, 10 мл 10% w/v aq. suspension (microParticles GmbH; Германия)) покрывали чередующимися слоями противоположно-заряженных полиэлектролитов PAAH и PSS путем послойного осаждения [11] по схеме PAAH/PSS/PAAH/PSS/PAAH, после чего нанесли завершающий слой PAA.

4. Подготовка кремниевой подложки фотонного кристалла для эксперимента с микросферами

Кремниевую подложку ФК перед экспериментом выдерживали в ультрафиолетовом очистителе не менее 30 мин.

К подготовленной подложке присоединяли измерительную микрофлюидную ячейку. Для прокачивания жидкости через измерительную ячейку использовали перистальтический насос. После сборки измерительной ячейки для активирования поверхности подложки ФК аминогруппами через нее пропускали водный раствор АПТЭС (1%) в течение 5 мин, при скорости потока 100 мкл/мин. После этого через измерительную ячейку пропускали поочередно, в течение 5 мин каждый, растворы PSS и PAAH в 0,5 М NaCl с концентрациями 100 мг/мл. При смене растворов ячейку промывали 0,5 М NaCl. Для равномерного покрытия поверхности подложки последовательно наносили три бислоя PSS/PAAH. После нанесения последнего слоя PAAH, среду поменяли на натрий-фосфатный буфер концентрацией 100 мМ (pH 8,0), содержащий 0,5 М NaCl. Описанные выше микросферы суспендировали в том же буфере в концентрации 10⁶ микросфер на 1 мл. Суспензию микросфер пропускали через измерительную ячейку при скорости 100 мкл/мин в течение 10 мин.

5. Подготовка кремниевой подложки фотонного кристалла для экспериментов с белками

Фотонно-кристаллическую подложку выдерживали в ультрафиолетовом очистителе по 30 мин для очистки каждой стороны ФК и затем обрабатывали по 5 мин

ультразвуком последовательно в ацетоне, этаноле и трижды в воде milliQ, после чего сушили при 70 °С. Очищенную подложку инкубировали в 1% растворе АПТЭС в ацетоне в течение 16 ч, чтобы функционализировать поверхность подложки аминогруппами, после чего прокачивали при 120 °С в течение 90 мин. Полученные аминированные подложки могут храниться не менее месяца без потери своих свойств. Перед измерением подложку обрабатывали 2,5% раствором глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 30 мин при слабом перемешивании. При подготовке подложек не использовали декстран или какой-либо другой каркасный полимер.

К подготовленной подложке присоединяли проточную ячейку. Скорость потока составляла 30 мкл/мин. Чтобы функционализировать поверхность подложки специфическими распознающими антителами, сначала через проточную ячейку пропускали раствор белка А (50 мкг/мл) в PBS до стабилизации сигнала, а затем промывали ячейку раствором PBS в течение 2 мин. После образования химически связанного с поверхностью монослоя белка А, через проточную ячейку пропускали раствор антител (50 мкг/мл) до достижения стабилизации сигнала. Наличие на поверхности подложки белка А, связывающего Fc-фрагмент иммуноглобулина, обеспечивало единообразную ориентацию связанных с ним молекул антител. Затем непрореагировавшие участки поверхности подложки блокировали 2% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS-буфере. После этого проточную ячейку промывали раствором PBS до выхода сигнала на плато. На последнем этапе, исследуемый образец пропускали через ячейку со скоростью 30 мкл/мин.

III. Осаждение микросфер, покрытых слоем полиэлектролита, на подложку, покрытую слоем противоположно заряженного полиэлектролита

Последовательное осаждение слоев полиэлектролитов на активированную АПТЭС поверхность подложки вызывает ступенчатое увеличение толщины поверхностного слоя (рис. 1А). Наблюдаемые значения толщины первых слоев PSS и PAAH меньше последующих, что свидетельствует о неполном покрытии поверхности первыми слоями полиэлектролитов.

Связывание на поверхности ФК микросфер, покрытых PAA, вызывает медленное увеличение наблюдаемой толщины поверхностного слоя, отсутствующее при пропускании буферного раствора, не содержащего микросфер.

Отметим, что кинетика связывания микросфер имеет линейный характер ($R^2 = 0,996$), а не зависимость типа «доза-ответ» (рис. 1Б). Это можно объяснить низкой концентрацией микросфер, далекой от насыщения поверхности подложки (площадь поверхности подложки, взаимодействующая с раствором, в соответствии с конструкцией измерительной ячейки, равна 1 см²). Площадь, занимаемая одной микросферой на поверхности подложки, не превышает 13 мкм², т. е. для полного покрытия поверхности необходимо $\sim 10^7$ микросфер. Можно предположить, что толщина монослоя микросфер должна быть равна диаметру микросферы, т. е. 4,08 мкм. Соответственно, связывание 10⁶ микросфер должно соответствовать наблюдаемой толщине поверхностного слоя в 400 нм. Однако при малых значениях толщины можно измерить только оптическую толщину слоя, т. е. физическую толщину, умноженную на показатель

преломления. Приняв показатель преломления равным 1,56 [10], получим ожидаемую толщину в 624 нм, которая соответствует наблюдаемой. Зная скорость потока, скорость увеличения толщины поверхностного слоя и концентрацию микросфер, можно приблизительно оценить количество связанных микросфер. За 10 мин пропускания 106 микросфер поверхностный слой увеличивается на 0,57 нм, что соответствует связыванию приблизительно 1×10^3 микросфер. Таким образом, наблюдается связывание около 0,001 части от общего количества прокачиваемых микросфер.

IV. Детекция бактериальных токсинов

Для демонстрации детекции белковых токсинов в растворе с помощью ПВФК-биосенсора выбрали два токсина — экзотоксин бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и термолabile токсин бактерии *Escherichia coli*.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) — грамотрицательная подвижная палочковидная бактерия размерами 1–5 мкм на 0,5–1 мкм, обитает в воде и почве, условно патогенна для человека и является возбудителем нозокомиальных инфекций. Экзотоксин А бактерии состоит из трех доменов: связывающего, транспортного и катализирующего. Его цитотоксическое действие обусловлено катализирующим доменом, который ингибирует синтез белков путем АДФ-рибозилирования фактора элонгации EF-2 [12–13]. Детекция экзотоксина А является важной диагностической задачей, для решения которой применяют ПЦР (определение соответствующего гена) [14], ИФА (детекция присутствия экзотоксина) и другие аналитические методы.

Escherichia coli (кишечная палочка) — грамотрицательная палочковидная бактерия, обитающая в нижних отделах кишечника теплокровных животных. Энтеротоксигенные штаммы *Escherichia coli* способны вызывать диарею за счет продукции токсинов, в частности термолabileного токсина

ЛТ. Токсин состоит из двух субъединиц: каталитически активной субъединицы А и субъединицы В, отвечающей за связывание с клеткой [15]. Экспрессия ЛТ не только стимулирует секрецию, но и способствует связыванию бактерий с клетками эпителия [16].

Для детекции токсинов была разработана специальная система измерительных ячеек с одним, двумя или четырьмя каналами. Стеклоанная камера с одной, двумя или четырьмя полостями присоединяется к чувствительной поверхности подложки из оксида кремния, которую после химической активации функционализируют распознающими молекулами. Амплитуда сигнала, регистрируемого при взаимодействии антиген–антитело на поверхности сенсора, прямо пропорциональна количеству связывающихся сайтов на поверхности. Непрореагировавшую поверхность сенсора покрывают БСА, чтобы избежать неспецифического сигнала.

У ячеек с двумя или четырьмя каналами можно использовать один из каналов в качестве отрицательного контроля; его поверхность вместо антител покрывают БСА.

Раствор экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* с концентрацией 50 мкг/мл в буфере PBS пропускали через измерительную ячейку со скоростью 100 мкл/мин (рис. 2). Полученная кривая аналогична сенсограмме поверхностного плазмонного резонанса и следует той же кинетике [17]. Связывание белка с поверхностью сенсора вызывает стремительный рост толщины поверхностного слоя, который через некоторое время достигает плато. Плато соответствует стационарному состоянию, когда скорости адсорбции и десорбции равны. Кинетическая кривая может быть аппроксимирована моделью адсорбции Лэнгмюра. Теоретически предсказано, что массовый предел детекции с помощью ПВФК составляет 70 фг/мм² зондируемого участка поверхности сенсора, что существенно превышает чувствительность метода поверхностного плазмонного резонанса [18]. На практике, однако, несмотря на небольшой уровень шума, минимальная концентрация экзотоксина А, которая могла

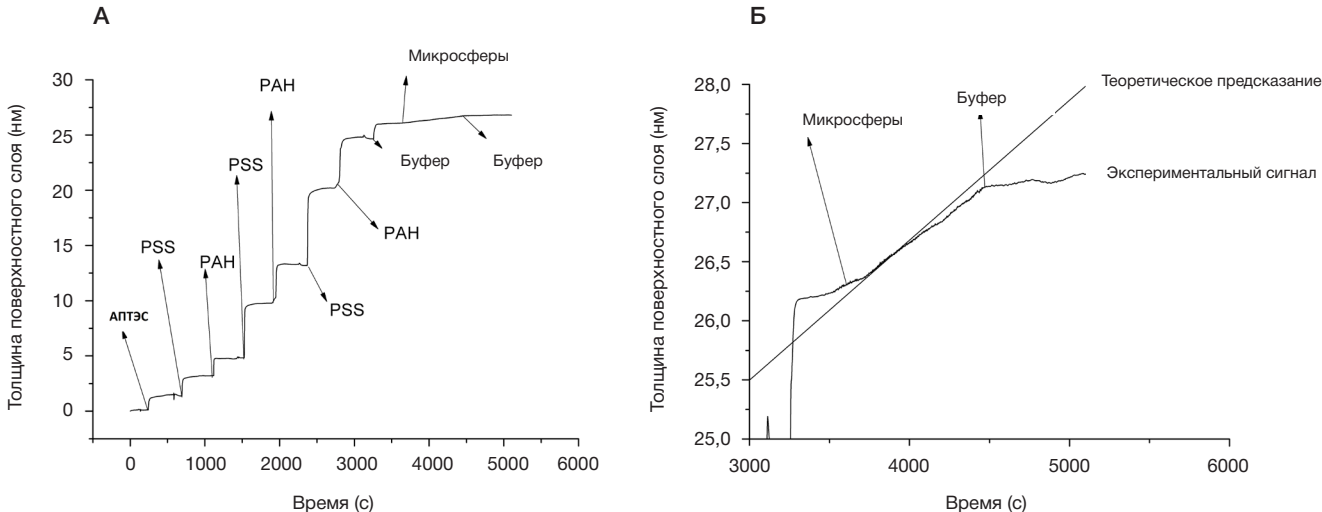


Рис. 1. Изменение толщины поверхностного слоя биосенсора на основе фотонного кристалла на последовательных этапах предварительной обработки его поверхности и проведении модельного эксперимента по взаимодействию микросфер, покрытых слоем полиэлектrolита, с подложкой фотонного кристалла, покрытой противоположно заряженным полиэлектrolитом. **А.** Показана динамика изменения толщины поверхностного слоя фотонного кристалла при последовательной обработке поверхности фотонного кристалла аминированием (обработка АПТЭС) и при осаждении слоев противоположно заряженных полиэлектrolитов: поли(4-стиренсульфонат) натрия (PSS) и поли(аллиламин)-гидрохлорид (PAH). Обращает на себя внимание увеличение наблюдаемой толщины для каждого из последующих поверхностных слоев полиэлектrolита. Эффект пропускания через микрофлюидную ячейку натрий-фосфатного буфера (pH 8.0), содержащего 0,5 М NaCl, отмечен стрелкой с надписью «буфер». Микросферы, моделирующие бактерии, были суспендированы в том же буфере; эффект пропускания суспензии микросфер отмечен стрелкой с надписью «микросферы». **Б.** Представлена динамика увеличения наблюдаемой толщины поверхностного слоя фотонного кристалла в процессе пропускания через ячейку суспензии микросфер, покрытых поли(акриловой) кислотой (PAA). В точке, обозначенной стрелкой с надписью «буфер», пропускание через ячейку суспензии микросфер прекращено и начата прокачка буфера. Показаны также результаты теоретического моделирования связывания модельных микросфер с поверхностью фотонного кристалла (см. текст)

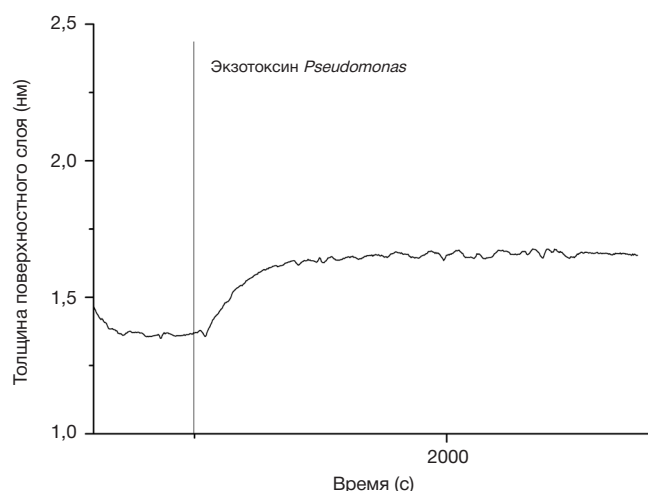


Рис. 2. Пример детекции экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* с помощью биосенсора, основанного на принципе детекции изменения распространения поверхностных волн в фотонном кристалле

быть определена в эксперименте, составила 30 мкг/мл. На сенсограмме детекции термолабильного токсина LT (50 мкг/мл в PBS) массовый предел детекции составил 10 мкг/мл (рис. 3).

Следует отметить, что в эксперименте работали с цельной антисывороткой. Использование аффинно-очищенных антител, безусловно, позволит достичь предела чувствительности, близкого к рассчитанному [18] и существенно превышающего чувствительность метода поверхностного плазмонного резонанса.

V. Кинетика связывания бактериальных клеток с поверхностью сенсора, функционализированной антителами

Верхний предел скорости связывания микросфер по формуле Смолуховского–Левича [19] составляет 3,46 частиц/см²; так как рабочая площадь поверхности сенсора в данном случае составляет 1 см², этот результат соответствует связыванию около 2000 частиц за 10 мин. Можно сделать вывод, что скорость связывания микросфер, покрытых полиэлектролитом, с поверхностью биосенсора, покрытого слоем противоположно заряженного полиэлектролита, в данной системе близка к предельно возможной. Вероятно, значение скорости не достигает максимума, так как связывание микросферы с поверхностью не происходит мгновенно, и в реальных условиях кинетика определяется не только диффузией микрочастиц, но и их взаимодействием с поверхностью. Поэтому можно предположить, что кинетика связывания бактериальных клеток с поверхностью сенсора, функционализированной антителами, может отличаться от продемонстрированной на микросферах.

Следует отметить, что изменение состава раствора, содержащего микросферы, не вызывает принципиальных изменений в кинетике связывания.

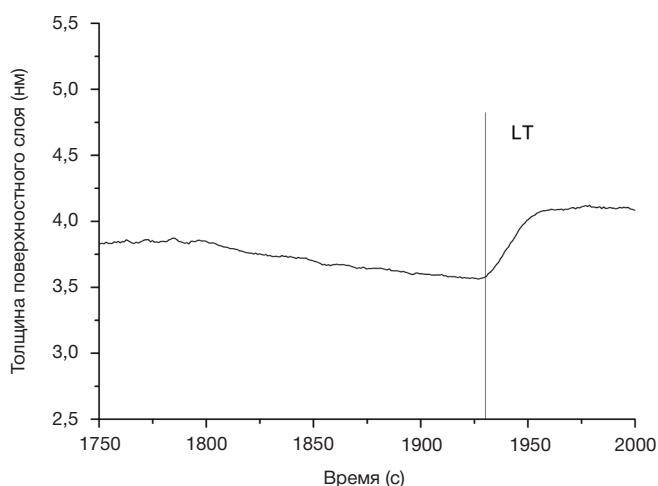


Рис. 3. Пример детекции термолабильного токсина LT бактерии *Escherichia coli* с помощью биосенсора, основанного на принципе детекции изменения распространения поверхностных волн в фотонном кристалле

VI. Оптимизация детекции бактериальных токсинов

Полученные результаты показывают принципиальную возможность проведения многопараметрической детекции бактериальных токсинов с помощью ПВФК-биосенсора. Предел детекции токсинов можно снижать: (1) использованием аффинно-очищенных антител к токсинам; сродство антител к антигенам крайне важно, так как каждая неаффинная молекула уменьшает полезную площадь чувствительной поверхности сенсора; (2) изменением параметров измерительной ячейки [20]; (3) усилением сигнала с помощью золотых наночастиц; поскольку интенсивность сигнала от ПВФК зависит от массопереноса, использование в качестве дополнительной метки специфических антител, распознающих стерически удаленный эпитоп целевого белка и конъюгированных с коллоидным золотом, позволит значительно усилить ответ при той же концентрации детектируемого аналита [21–22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показана принципиальная возможность детекции в жидкой пробе микрочастиц, соответствующих по размерам бактериальной клетке, с помощью детекции ПВФК. Полученные результаты могут быть полезны для разработки протоколов детекции бактериальных клеток в реальном времени в проточном режиме. Продемонстрирована возможность многопараметрической детекции бактериальных токсинов белковой природы — экзотоксина А бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и термолабильного токсина LT бактерии *Escherichia coli*. Полученные результаты позволят разработать быстрые и доступные по стоимости методы детекции бактериального обсеменения пищевых продуктов и воды, а также диагностики бактериальных инфекций путем обнаружения бактерий и их метаболитов в образцах биологических жидкостей.

Литература

1. Wilson MS. Electrochemical Immunosensors for the Simultaneous Detection of Two Tumor Markers. *Anal Chem.* 2005; 77 (5): 1496–1502.
2. Xu T, Jia X, Chen X, Ma Z. Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using metal ions tagged immunocolloidal gold. *Biosens Bioelectron.* 2014; (56): 174–9.

3. Zong C, Wu J, Wang C, Ju H, Yan F. Chemiluminescence Imaging Immunoassay of Multiple Tumor Markers for Cancer Screening. *Anal Chem.* 2012; 84 (5): 2410–15.
4. Zhao Y, Zhao X, Pei X, et al. Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array. *Anal Chim Acta.* 2009; 633 (1): 103–8.
5. Ravalli A, Gomes C, Yamanaka H, Marrazza G. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection : The case of HER2. *Bioelectrochemistry.* 2015; 106 (Pt B): 268–75.
6. Gomes RS, Moreira FTC, Fernandes R, Sales MGF. Sensing CA 15–3 in point-of-care by electropolymerizing O-phenylenediamine (oPDA) on Au-screen printed electrodes. *PLoS One.* 2018; 13(5): [about 1 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196656>
7. Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Switzerland).* 2015; 15 (5): 10481–510.
8. Michelotti F, Sciacca B, Dominici L, Quaglio M. Fast optical vapour sensing by Bloch surface waves on porous silicon membranes. *Phys Chem Chem Phys.* 2010; (12): 502–6.
9. Khan MU, Corbett B. Bloch surface wave structures for high sensitivity detection and compact waveguiding. *Sci Technol Adv Mater.* 2016; 17 (1): 398–409
10. Konopsky V, Karakouz T, Alieva E, Vicario C, Sekatskii S, Dietler G. Photonic Crystal Biosensor Based on Optical Surface Waves. *Sensors.* 2013; 13 (3): 2566–78.
11. Bilan RS, Krivenkov VA, Berestovoy MA, et al. Engineering of Optically Encoded Microbeads with FRET-Free Spatially Separated Quantum-Dot Layers for Multiplexed Assays. *Chem Phys Chem.* 2017; 18 (8): 970–9.
12. Toren P, Ozgur E, Bayindir M. Label-Free Optical Biodetection of Pathogen Virulence Factors in Complex Media Using Microtoroids with Multifunctional Surface Functionality. *ACS Sensors.* 2018; 3 (2): 352–9.
13. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D. Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A: Adenosine Diphosphate-Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 In Vitro and In Vivo. 1977; 15 (1): 138–44.
14. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 (10): 3739–45.
15. Norton EB, Branco LM, Clements JD. Evaluating the A-Subunit of the Heat-Labile Toxin (LT) As an Immunogen and a Protective Antigen Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *PLoS One.* 2015; 10 (8): [about 1 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549283/>
16. Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of Heat-Labile Enterotoxin in Colonization of the Adult Mouse Small Intestine by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun.* 2006; 74 (2): 869–75.
17. Schasfoort RBM, Tudos AJ, editors. *Handbook of Surface Plasmon Resonance.* Лондон: RSC Publisher; 2013. 524 c.
18. pcbiosensors.com [Internet]. Troitsk: PCbiosensors company. 2013 — [cited July 18, 2018.]. Available at: <http://pcbiosensors.com/technology/technology.htm>.
19. Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE : Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. *Biophysical Journal.* 1998; 75 (August): 583–94.
20. Lynn NS, Homola J. Biosensor Enhancement Using Grooved Micromixers: Part I, Numerical Studies. *Anal Chem.* 2015; 87 (11): 5524–30.
21. Springer T, Homola J. Biofunctionalized gold nanoparticles for SPR-biosensor-based detection of CEA in blood plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404 (10): 2869–75.
22. Lee J, Cho H, Choi HK, Lee J-Y, Choi J-W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (7): [about 14 p.]. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/2021>

References

1. Wilson MS. Electrochemical Immunosensors for the Simultaneous Detection of Two Tumor Markers. *Anal Chem.* 2005; 77 (5): 1496–1502.
2. Xu T, Jia X, Chen X, Ma Z. Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using metal ions tagged immunocolloidal gold. *Biosens Bioelectron.* 2014; (56): 174–9.
3. Zong C, Wu J, Wang C, Ju H, Yan F. Chemiluminescence Imaging Immunoassay of Multiple Tumor Markers for Cancer Screening. *Anal Chem.* 2012; 84 (5): 2410–15.
4. Zhao Y, Zhao X, Pei X, et al. Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array. *Anal Chim Acta.* 2009; 633 (1): 103–8.
5. Ravalli A, Gomes C, Yamanaka H, Marrazza G. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection : The case of HER2. *Bioelectrochemistry.* 2015; 106 (Pt B): 268–75.
6. Gomes RS, Moreira FTC, Fernandes R, Sales MGF. Sensing CA 15-3 in point-of-care by electropolymerizing O-phenylenediamine (oPDA) on Au-screen printed electrodes. *PLoS One.* 2018; 13(5): [about 1 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196656>
7. Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Switzerland).* 2015; 15 (5): 10481–510.
8. Michelotti F, Sciacca B, Dominici L, Quaglio M. Fast optical vapour sensing by Bloch surface waves on porous silicon membranes. *Phys Chem Chem Phys.* 2010; (12): 502–6.
9. Khan MU, Corbett B. Bloch surface wave structures for high sensitivity detection and compact waveguiding. *Sci Technol Adv Mater.* 2016; 17 (1): 398–409
10. Konopsky V, Karakouz T, Alieva E, Vicario C, Sekatskii S, Dietler G. Photonic Crystal Biosensor Based on Optical Surface Waves. *Sensors.* 2013; 13 (3): 2566–78.
11. Bilan RS, Krivenkov VA, Berestovoy MA, et al. Engineering of Optically Encoded Microbeads with FRET-Free Spatially Separated Quantum-Dot Layers for Multiplexed Assays. *Chem Phys Chem.* 2017; 18 (8): 970–9.
12. Toren P, Ozgur E, Bayindir M. Label-Free Optical Biodetection of Pathogen Virulence Factors in Complex Media Using Microtoroids with Multifunctional Surface Functionality. *ACS Sensors.* 2018; 3 (2): 352–9.
13. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D. Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A: Adenosine Diphosphate-Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 In Vitro and In Vivo. 1977; 15 (1): 138–44.
14. Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 (10): 3739–45.
15. Norton EB, Branco LM, Clements JD. Evaluating the A-Subunit of the Heat-Labile Toxin (LT) As an Immunogen and a Protective Antigen Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *PLoS One.* 2015; 10 (8): [about 1 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549283/>
16. Allen KP, Randolph MM, Fleckenstein JM. Importance of Heat-Labile Enterotoxin in Colonization of the Adult Mouse Small Intestine by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun.* 2006; 74 (2): 869–75.
17. Schasfoort RBM, Tudos AJ, editors. *Handbook of Surface Plasmon Resonance.* Лондон: RSC Publisher; 2013. 524 c.
18. pcbiosensors.com [Internet]. Troitsk: PCbiosensors company. 2013 – [cited July 18, 2018.]. Available at: <http://pcbiosensors.com/technology/technology.htm>.
19. Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE :

- Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data. Biophysical Journal. 1998; 75 (August): 583–94.
20. Lynn NS, Homola J. Biosensor Enhancement Using Grooved Micromixers: Part I, Numerical Studies. Anal Chem. 2015; 87 (11): 5524–30.
21. Springer T, Homola J. Biofunctionalized gold nanoparticles for SPR-biosensor-based detection of CEA in blood plasma. Anal Bioanal Chem. 2012; 404 (10): 2869-75.
22. Lee J, Cho H, Choi HK, Lee J-Y, Choi J-W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. Int J Mol Sci. 2018; 19 (7): [about 14 p.]. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/2021>

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ АЭРОЗОЛЬНЫЙ ПРОБООТБОРНИК С РЕЦИРКУЛЯЦИЕЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ

А. Э. Акмалов¹, Г. Е. Котковский¹✉, С. В. Столяров¹, Б. И. Вердиев², Р. С. Овчинников², А. А. Почтовый², А. П. Ткачук², А. А. Чистяков¹

¹ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

Обнаружение биогенных аэрозолей является важной задачей при обеспечении безопасности жизнедеятельности человека в современных условиях. На практике часто требуется собирать аэрозоли с больших площадей за малый промежуток времени, что накладывает жесткие ограничения на эффективность пробоотбора, величину прокачиваемого в единицу времени объема воздуха и жизнеспособность собранного биоматериала. В работе представлены результаты по разработке и испытанию устройства отбора аэрозольных проб с высокой объемной скоростью и двухступенчатым концентрированием аэрозольных частиц — виртуального импактора и циклонного коллектора с рециркулирующей жидкой фазой. Приведены алгоритм и результаты расчета параметров импактора, результаты испытаний устройства на модельных сухих и жидких тест-препаратах для частиц размерами 0,5–5 мкм. Подтверждено, что при объемных скоростях пробоотбора выше 4000 л/мин эффективность отбора в жидкую фазу объемом до 10 мл составляет более 20% массовой доли распыленного аэрозоля, а при объемных скоростях выше 300 л/мин — более 60% массовой доли. Показано, что устройство сохраняет жизнеспособность отобранного биоматериала. Пробоотборник реализован в портативном варианте, обладает возможностью настройки всех параметров отбора и очистки, а также управления по сети.

Ключевые слова: аэрозоли, биопатогены, эффективность, пробоотборник, импактор, объемная скорость, циклон

Финансирование: Федеральная целевая программа «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 г.)», государственный контракт №К-27-НИР/148-2 между Министерством здравоохранения Российской Федерации и Национальным исследовательским ядерным университетом «МИФИ».

✉ **Для корреспонденции:** Геннадий Евгеньевич Котковский
Каширское шоссе, 31, г. Москва, 115409; geko@mail.ru

Статья получена: 27.07.2018 **Статья принята к печати:** 23.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.049

HIGH-PERFORMANCE AEROSOL SAMPLER WITH LIQUID PHASE RECIRCULATION AND PRE-CONCENTRATION OF PARTICLES

Akmalov AE¹, Kotkovskii GE¹✉, Stolyarov SV¹, Verdiev BI², Ovchinnikov RS², Pochtovyy AA², Tkachuk AP², Chistyakov AA¹

¹ National Research Nuclear University MEPhI, Moscow

² Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Testing the surrounding environment for the presence of biogenic aerosols is crucial in ensuring its safety for the population. It is often necessary to collect aerosol samples from large areas in short time, which demands excellent particle collection efficiency, a sufficient incoming air flow rate and a capacity to maintain the viability of the collected samples. Below we present the aerosol sampler with a high volumetric flow rate based on a two-stage particle concentration algorithm and consisting of a virtual impactor and a cyclone concentrator with a recirculating liquid phase. We provide all necessary calculations and an algorithm for modeling impactor parameters. The sampler was tested using dry and liquid formulations dispersed into the particles of 0.5 to 5 µm in diameter. We demonstrate that at volumetric flow rates over 4,000 l/min efficiency of particle collection into the liquid phase at a volume of 10 ml makes over 20% of the total aerosol mass and at volumetric flow rates over 300 l/min this value is over 60%. The proposed device maintains viability of the collected microorganisms. The sampler is portable, with flexible settings for sampling and cleaning, and can be controlled remotely over the network.

Keywords: aerosols, pathogens, efficiency, sampler, impactor, volumetric flow rate, cyclone

Funding: this work was supported by the Federal Target Program *The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020)*, the state contract No. K-27-НИР/148-2 signed by the Ministry of Healthcare of the Russian Federation and the National Research Nuclear University MEPhI.

✉ **Correspondence should be addressed:** Gennadii E. Kotkovskii
Kashirskoe shosse, 31, Moscow, 115409; geko@mail.ru

Received: 27.07.2018 **Accepted:** 23.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.049

Обнаружение в воздухе патогенных, аллергенных, и иммуногенных микроорганизмов имеет решающее значение при разработке программ, обеспечивающих безопасное существование человека в окружающей среде. С развитием биотехнологий в настоящее время к ранее существующим добавились новые источники биоаэрозольного загрязнения,

возникшие в результате применения генной инженерии штаммов микроорганизмов в производстве фармацевтических препаратов, ферментов и пищевых заменителей [1]. Загрязненный воздух может характеризоваться высокими концентрациями микроорганизмов (до 10⁶ КОЕ/м³), являющихся возбудителями инфекционных и аллергических

респираторных заболеваний человека [2]. Особое внимание требуется уделять целенаправленному загрязнению воздуха патогенами в результате актов биотерроризма.

Традиционно для обнаружения и количественной оценки биоаэрозолей часто используют методы отбора проб с помощью фильтров, импінжеров или импакторов, в которых микроорганизмы не могут выжить от стресса, вызванного процессом пробоотбора [3]. Между тем, жизнеспособность пробы чрезвычайно важна, например в случае для отбора проб микрофлоры, позволяющих избегать чрезмерного физического воздействия на микроорганизмы, и поддерживающих их физиологические свойства. Наиболее перспективны в этом отношении пробоотборники с жидкой фазой поглощения [4], которые отделяют микроорганизмы от аэрозольных носителей и обеспечивают их точное определение в виде одиночных клеток.

Сформулированы основные требования к устройству пробоотборника для обнаружения биопатогенов в воздушной среде [5–8]. Во-первых, это большая объемная скорость прокачки воздуха, необходимая для обнаружения патогенов низкой концентрации при отборе пробы в разумном временном интервале. Во-вторых, высокая эффективность улавливания аэрозольных частиц и их концентрирование в малом объеме жидкости для дальнейшего анализа. В-третьих, использование мягких, щадящих для микроорганизмов условий осаждения и защитных компонент в составе абсорбционной жидкости. Наконец, необходимыми требованиями являются наличие низкого аэродинамического сопротивления у пробоотборника, а также низкий уровень шума и энергопотребление.

Устройства для отбора биогенных аэрозолей из воздушной среды, функционирующие на основе различных физических принципов, разрабатываются и выпускаются на протяжении длительного периода времени. Определенные недостатки присущи каждому типу этих устройств. Создание пробоотборника с высокой эффективностью улавливания патогенов, скоростью отбора пробы более 3000 л/мин, возможностью получения жизнеспособного концентрированного из воздушной пробы материала в малом объеме жидкости, с низким уровнем шума и низким энергопотреблением, до сих пор остается проблемой, требующей своего решения.

Целью работы было создание высокопроизводительного устройства для отбора и концентрирования биоаэрозолей из воздушной фазы для дальнейшего проведения анализа отобранных проб на наличие патогенных бактерий и вирусов.

I. Дизайн эксперимента

В основу устройства был заложен принцип двухступенчатого последовательного концентрирования, позволяющий работать с большими объемными скоростями прокачки. На первой ступени осуществляется концентрирование частиц за счет принудительного резкого изменения направления движения входного воздушного потока при прокачке через щелевой виртуальный импактор [9, 10]. Направление выходного воздушного потока, содержащего концентрированные частицы, совпадает с первоначальным направлением входного потока, а его величина в несколько раз меньше. Вторая ступень включает в себя осаждение концентрированных частиц в пленке жидкости, непрерывно циркулирующей в циклонном коллекторе с жидкой фазой [3, 11]. Увеличение времени циркуляции при продолжающемся поступлении частиц приводит к

возрастанию их концентрации в жидкой фазе. Рассмотрим подробнее основные этапы разработки устройства.

1. Создание виртуального импактора

При создании виртуального импактора проводили предварительный расчет значений ширины и длины его щелей: входных, куда поступает весь прокачиваемый воздушный поток, и выходных, в которые проходит воздушный поток с уменьшенной объемной скоростью, содержащий концентрированные частицы. Величина входного потока варьировалась от 3000 до 5000 л/мин, размеры селективируемых аэрозольных частиц от 0,5 до 5 мкм. Согласно [12], число Рейнольдса и отношение длины промежутка между входной и выходной щелями к ширине входной щели определяют форму кривой зависимости эффективности селективирования частиц, измеряемой в процентах, от их аэродинамического диаметра. Диаметр, соответствующий 50%-й эффективности селективирования, определяется как

$$d_{50} = \left(\sqrt{\frac{9\eta W}{\rho_p C_c U}} \right) \times \sqrt{S_{k50}}, \quad (1)$$

где ρ_p — плотность частицы; C_c — поправка Каннингема, учитывающая увеличение подвижности частиц, размер которых сравним со средней длиной пробега молекул газа; U — линейная скорость частицы; η — вязкость воздуха или газа; W — ширина щели; S_{k50} — число Стокса, соответствующее диаметру d_{50} . Расчет состоял в выборе таких размеров щелей, которые при объемных скоростях до 5000 л/мин обеспечивали бы число Рейнольдса

$$Re = \frac{\rho_{\text{воздуха}} W U}{\eta}$$

в диапазоне 500–3000 [12]. После этого на основании зависимостей числа S_{k50} от числа Re , полученных в [13], определяли S_{k50} , а далее по формуле (1) вычисляли значение d_{50} , которое должно быть не больше минимального требуемого диаметра аэрозолей равного 0,5 мкм. Получили 20 вариантов размеров щелей с различными значениями числа Рейнольдса и d_{50} .

Следующая стадия разработки виртуального импактора включала в себя построение модели секции виртуального импактора на основании полученных при расчетах параметров щелей, моделирование движения частиц воздуха в секции виртуального импактора и получение распределения частиц воздуха по скоростям в каждой точке области расчета для одной секции. Использовали систему автоматического моделирования Solid Works 2014 с приложением Flow Simulation.

На третьем этапе проводили расчетную проверку эффективности концентрирования частиц при выбранных параметрах с учетом полученного распределения частиц воздуха по скоростям. Использовали специально написанную программу обработки в среде MathLab. Программа рассчитывала смещение массива, включающего в себя 100 аэрозольных частиц, при движении между щелями. Производили пошаговое вычисление координаты каждой частицы с учетом центростремительного ускорения, обусловленного силой Стокса, появляющейся при взаимодействии аэрозольной частицы с воздушным потоком при его повороте в ходе движения между щелями (рис. 1). Оценивали попадание частиц в щель выходного потока.

На последнем этапе проводили экспериментальную проверку эффективности созданного виртуального импактора при совместной работе с циклонным коллектором.

2. Создание циклонного коллектора

При создании циклонного коллектора с жидкой фазой использовали расчеты [3], позволяющие определить эффективность захвата частиц жидкой фазой в зависимости от высоты и радиуса цилиндрической трубки, по стенкам которой циркулирует жидкость (рис. 2). Предполагали, что величина входного потока для циклонного коллектора равна величине выходного потока виртуального импактора. Для возможности рециркуляции жидкости в циклонном коллекторе предусматривали отдельный канал.

II. Проведение испытаний пробоотборника

Изготовленные виртуальный импактор и циклонный коллектор соединяли гибким воздуховодом и испытывали как совместно, так и раздельно, проверяя эффективность сбора аэрозолей. Испытания проводили в ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Сергиев Посад), Московском метрополитене и в ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России (г. Москва).

Испытания в ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России проводили с использованием модельного сухого тест-препарата без биопатогенов в течение 10 дней. При проведении испытаний импактор устройства размещали внутри статической аэрозольной камеры, а циклонный коллектор, соединенный воздуховодом с импактором, — вне ее. Контроль интегральной концентрации и дисперсного состава аэрозоля, определение его массы в сорбирующих жидкостях проводили флуоресцентным и хемилюминесцентным методами. Эффективность работы пробоотборных устройств оценивали относительно пробоотборника КПК-3. С помощью импульсно-пневматического аппарата в статической камере создавали аэрозоль модельного сухого тест-препарата. С помощью прибора КПК-3 и четырехкаскадного импактора Мея

оценивали интегральную массовую концентрацию аэрозоля и его дисперсный состав.

Испытания в досмотровых зонах вестибюлей станций «Черкизовская» и «Новокосино» Московского метрополитена проводили для определения эффективности созданного устройства в сравнении с комплектом для забора аэрозольной пробы SASS 4000/2300 (Research International Inc.; США). Собранные образцы направляли для микробиологического анализа и биомолекулярных исследований с целью определения состава микробиоты и ее количественного содержания.

III. Микробиологические исследования полученных образцов

В работе были использованы готовые агаризованные питательные среды в чашках Петри (ЦФГС; Россия): колумбийский агар с дефибрированной кровью, среда Байрда–Паркера, среда Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом, среда Эндо, среда энтерококк-агар и приготовленная самостоятельно среда LB-агар (lysogeny broth, состав (г/л): 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 17 г агара). Перед посевом питательные среды прогревали до комнатной температуры. При необходимости подсушивали в термостате для удаления конденсата. Для посева образца использовали по 1 чашке каждой питательной среды (по 6 сред на образец).

Посев жидких образцов на питательные среды осуществляли автоматической пипеткой в объеме 0,1 мл на чашку Петри. Жидкость равномерно распределяли по поверхности среды стерильным L-образным шпателем.

Посевы инкубировали при температуре 37 °C в течение 48 ч. Посевы на среде Сабуро при отсутствии видимого роста продолжали инкубировать при комнатной температуре до 7 сут. включительно.

На каждой из питательных сред проводили учет выросших колоний, описывая их морфологические типы (МТ). Каждому МТ присваивали индивидуальный номер и проводили фотографирование колоний. Изолированные колонии отсеивали на питательные среды для дальнейшей

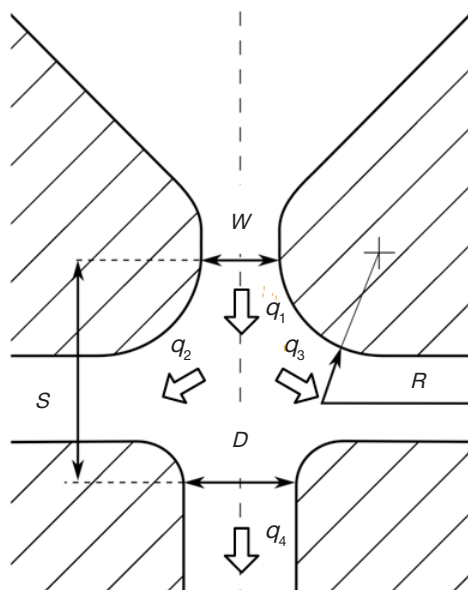


Рис. 1. Схема сечения виртуального импактора в поперечном разрезе. W — ширина входной щели; D — ширина выходной щели; S — расстояние между щелями; q_1 — входной поток; q_4 — выходной поток с концентрированными аэрозольными частицами; q_2 и q_3 — отбрасываемый импактором поток

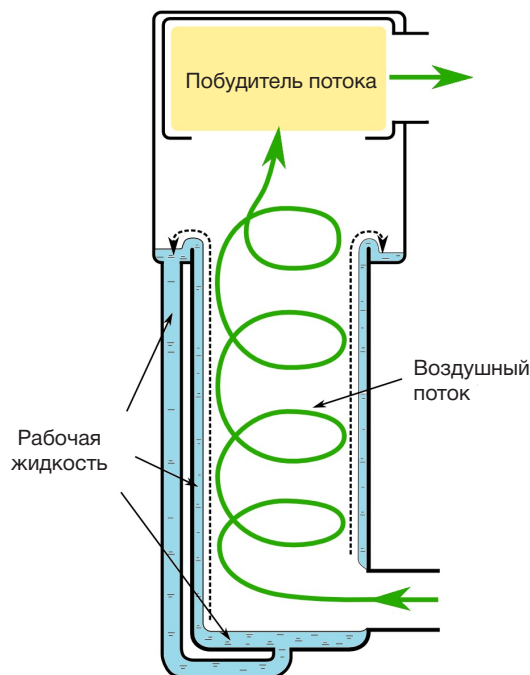


Рис. 2. Схема циклонного коллектора с жидкой фазой

идентификации и определения чувствительности к антибиотикам. При наличии характерных морфологических признаков осуществляли предварительную идентификацию выросших колоний до уровня рода.

Определение чувствительности выделенных культур к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом, с применением тестовых дисков (HiMedia; Индия) с антибиотиками: ампициллин, амоксилав, цефокситин, азитромицин, левофлоксацин, гентамицин, амикацин, тетрациклин, ванкомицин, новобиоцин, бацитрацин, оптохин и стандартизированной для этих целей среде Мюллера–Хинтона (ООО «ЦФГС», Россия).

Измеряли диаметры зон задержки роста (ЗЗР) культур бактерий вокруг дисков с антибиотиками, затем сравнивали их с референсными значениями и относили культуру к одной из трех категорий: *r* — устойчива, *s* — чувствительна, *i* — умеренно чувствительна.

Испытания в ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи проводили с целью сравнения эффективности работы созданного устройства и комплекта для забора аэрозольной пробы SASS4000/2300 (Research International Inc.; США) при использовании жидкого модельного тест-препарата. Измерения проводили в боксе микробиологической безопасности специального исполнения «Ламинар-С»

(ЗАО «Ламинарные системы»; Россия). Тест-препарат представлял собой 10% раствор сахарозы на карбонатном буфере (pH 9,6) (C3041; Sigma; Германия) с добавлением красителя флуоресцеина натрия в конечной концентрации 1 мкМ. Сравнивали интенсивность люминесценции пробы, собираемой устройствами в течение 5 мин при непрерывном распылении аэрозоля в камере в процессе отбора пробы.

IV. Моделирование параметров виртуального импактора и определение эффективности концентрирования частиц

В результате проведенных расчетов были получены зависимости эффективности концентрирования аэрозольных частиц с диаметром 0,5–5 мкм от параметров виртуального импактора (рис. 3–5). Эффективность определяли как отношение числа концентрированных, т. е. прошедших в выходной канал (рис. 1), частиц заданного размера к числу частиц во входном потоке.

Эффективность концентрирования возрастает с 18 до 36% для частиц 0,5 мкм при уменьшении размера входного сопла *W* от 0,07 до 0,05 см (рис. 3). Однако при переходе к значению *W* равному 0,04 см эффективность резко падает. Это явление отмечалось в литературе [14] и

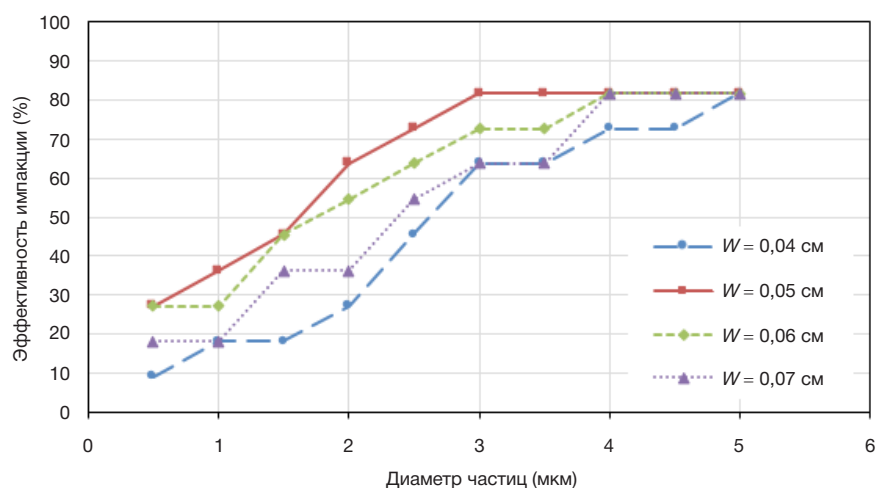


Рис. 3. Зависимость эффективности концентрирования аэрозольных частиц от их диаметра для различных значений ширины входной щели *W* (рис.1) виртуального импактора. Ширина выходной щели 0,07 см

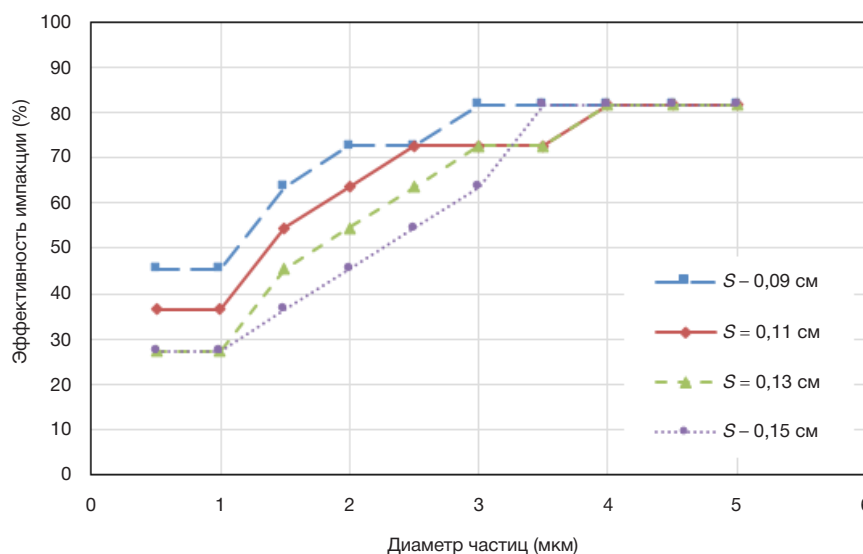


Рис. 4. Зависимость эффективности концентрирования аэрозольных частиц от их диаметра при различных расстояниях между входной и выходной щелью *S* (рис.1) виртуального импактора. Ширина входной и выходной щели 0,07 см

указывает на необходимость учета соотношения размеров входной и выходной щелей: входная щель должна быть на 30–40% меньше выходной для достижения максимальной эффективности концентрирования.

При расстояниях (S) между входной и выходной щелью равных 0,13 и 0,15 см эффективность концентрирования частиц размерами 0,5–1 мкм достигает 27% (рис. 4). При уменьшении этого расстояния до значения 0,09 см наблюдается увеличение эффективности концентрирования до 45%. Важно, что для частиц размером больше 4 мкм для всех значений S расчетное значение эффективности не превышает 82%.

Уменьшение радиуса (R) закругления входной щели до 0,06 см приводит к падению эффективности концентрирования аэрозольных частиц диаметром 1,5–5 мкм (рис. 5). Увеличение радиуса до 0,12 см поднимает эффективность концентрирования частиц с диаметром 0,5 мкм до 64%, а частиц с диаметрами от 2,5 мкм до 91%. Тем не менее к увеличению радиуса закругления входной щели следует относиться с осторожностью, так как расчеты поля скоростей воздушного потока указывают на возможную турбулентность воздушного потока между щелями в этом случае.

Результатами расчета параметров циклонного коллектора с жидкой фазой стали величины, определяющие эффективность импакции (перевода аэрозольных частиц в жидкую составляющую). Это радиус трубки $R = 42$ мм, ее высота $H = 100$ мм, диаметр входного сопла 15 мм для объемной скорости входного потока $Q = 350$ л/мин.

V. Результаты моделирования параметров виртуального импактора и испытания устройства

На рис. 6 представлена схема устройства отбора аэрозольных проб. Пробоотборник состоит из виртуального импактора, соединенного воздуховодом с циклонным коллектором.

Циклонный коллектор является управляющим модулем для всего устройства. Процесс управления осуществляется при помощи сенсорного экрана и полностью автоматизирован. Отбор пробы устройством протекает в ходе последовательных операций, которые в совокупности составляют законченный цикл. В общем виде цикл состоит из подачи жидкой фазы из резервуара в циклонный коллектор, отбора пробы путем

прокачки воздуха через модули устройства, выдачи жидкой фазы для анализа, очистки циклонного коллектора путем промывки. Длительность циклов и значения объемных скоростей прокачки могут регулироваться оператором. Объем жидкой фазы, выдаваемой устройством для дальнейшего анализа, составляет от 2,5 до 10 мл. Устройство может работать в сети по интерфейсу RS-485.

В табл. 1 представлены результаты испытаний устройства в ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России. Эффективность отбора пробы модельного сухого тест-препарата созданным устройством отбора аэрозольных проб достигала 20% от полной массы распыленных частиц. При этом объемная скорость прокачки созданного устройства в 100 раз больше, чем у пробоотборника КПК-3, обеспечивающего 100% сбора. Циклонный коллектор устройства, функционирующий без виртуального импактора, отбирает до 61% от полной массы распыленных частиц при скорости прокачки в 6 раз выше, чем у прибора КПК-3.

По результатам испытаний в Московском метрополитене был проведен микробиологический анализ 64 собранных образцов. Выделено и идентифицировано 48 морфологических типов (МТ) микроорганизмов, составляющих микробиоту воздуха и поверхностей метрополитена. Сравнение созданного устройства отбора аэрозольных проб с системой SASS и контрольным методом использования фильтров высокой плотности (нанофильтров) показало, что по количеству морфотипов высеиваемых из собранных образцов они не имеют больших различий (рис. 7).

У 4 из 5 изученных штаммов бактерий, выделенных в метрополитене с использованием клинического протокола, обнаружен тот или иной тип резистентности. У штамма *St. haemolyticus* MT22 обнаружена множественная резистентность — к макролидам и фторхинолонам. У *Streptococcus viridans* MT8 множественная резистентность обнаружена к макролидам, аминогликозидам и защищенным β -лактамам (табл. 2). Это говорит о возможной применимости прибора для контроля бактериологического состава и распространения антибиотикорезистентности в окружающей среде и в клинике.

Результаты количественного определения тотальной ДНК из отобранных проб, проведенного с помощью коммерческого набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen; США) также показали отсутствие

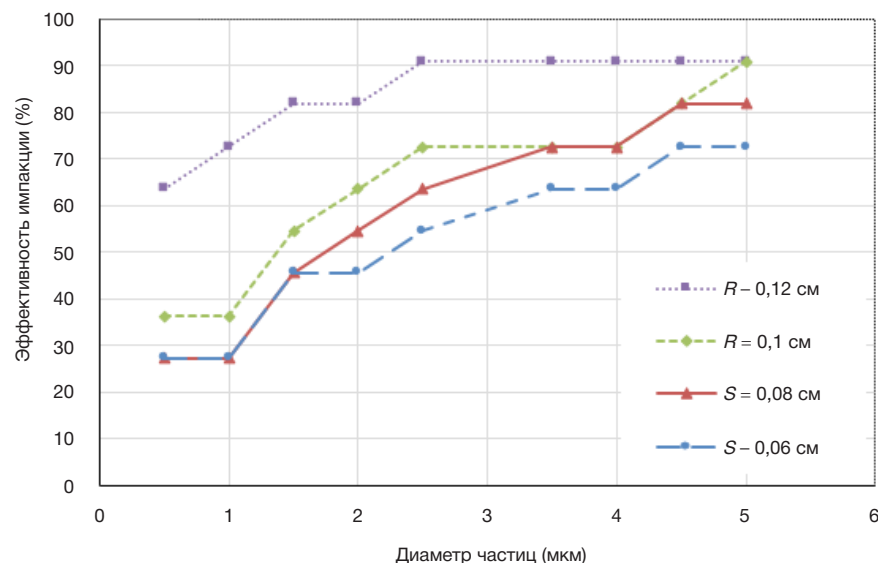


Рис. 5. Зависимость эффективности концентрирования аэрозольных частиц от радиуса закругления R входной щели. Ширина входной и выходной щели 0,07 см

явного преимущества одной из использованных систем пробоотбора. Обе системы на два порядка превосходят контрольный метод с использованием фильтров высокой плотности (нанофильтров).

Испытания в ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи с жидким тест-препаратом показали, что созданное устройство обеспечивает его сбор на уровне 96% от системы SASS по результатам 5 измерений с доверительной вероятностью 0,95.

VI. Пути оптимизации работы аэрозольного пробоотборника

Моделирование параметров виртуального импактора и экспериментальная проверка показывают, что при создании реального устройства основные трудности возникают при обеспечении концентрирования аэрозольных частиц с размерами менее 1 мкм. Получение 50% эффективности концентрирования таких частиц (d_{50}) в первую очередь связано с уменьшением ширины входных щелей. Уменьшение ширины щели с 0,5 до 0,4 мм приводит к снижению скорости входного потока в 1,5 раза, что в несколько раз уменьшает эффективность концентрирования. Для поддержания скорости входного потока необходимо во столько же раз увеличить перепад давления, обеспечиваемый вентилятором, что сразу приводит к росту энергопотребления и массогабаритов устройства. Представляется достаточно обоснованным говорить о том, что при требовании концентрирования аэрозольных частиц с размерами менее 1 мкм реально достижимая линейная скорость воздушного потока через входные щели не может быть больше 100 см/с, а разумная ширина щели не может быть менее 0,5 мкм. В созданном

устройстве при работе на максимальной мощности объемная скорость прокачки воздуха не превышает 4500 л/мин.

Эффективность осаждения аэрозольных частиц в жидкую фазу циклонным коллектором может быть увеличена за счет создания во входном патрубке искусственного распыления мелкодисперсных водяных капель. Отдельной оптимизации требует согласование значений аэродинамического сопротивления выходного тракта виртуального импактора и входного тракта циклонного коллектора, чего в данной работе сделано не было. При дальнейшем совершенствовании устройства

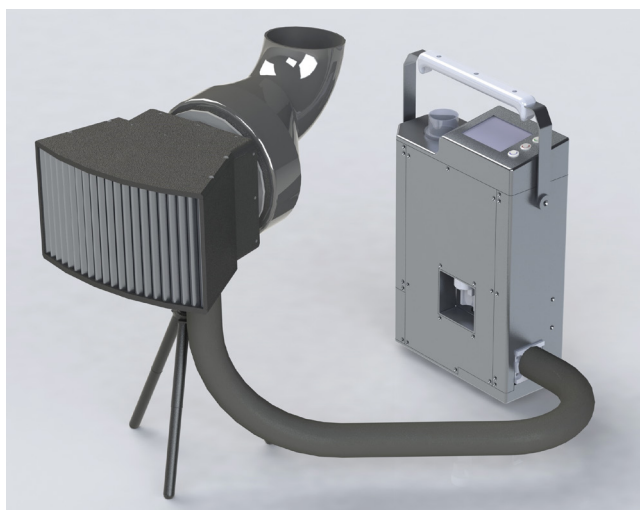


Рис. 6. Устройство Циклон-Био. Изображение устройства в сборе. Слева: импактор. Справа: циклонный коллектор

Таблица 1. Результат испытания прибора с использованием тест-препарата ФГБУ 48 ЦНИИ

Изделие	Интегральная массовая концентрация аэрозоля-имитатора, мг/л (число измерений 5, доверительная вероятность 0,95)	Продолжительность отбора пробы, мин	Объемная скорость отбора пробы, л/мин	Эффективность отбора пробы аэрозоля, %
Устройство отбора аэрозольных проб	$(1,91 \pm 0,18) \cdot 10^{-3}$	2	4325	$16 \pm 1,5$
	$(1,70 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$	2	4325	$20 \pm 2,1$
Циклонный коллектор устройства отбора аэрозольных проб	$(3,75 \pm 0,35) \cdot 10^{-3}$	2	325	61 ± 14
	$(2,91 \pm 0,27) \cdot 10^{-2}$	2	325	48 ± 125
Прибор контроля концентрации КПК-3	$(3,75 \pm 0,36) \cdot 10^{-3}$	2	50	100,0
	$(2,91 \pm 0,28) \cdot 10^{-2}$	2	50	100,0

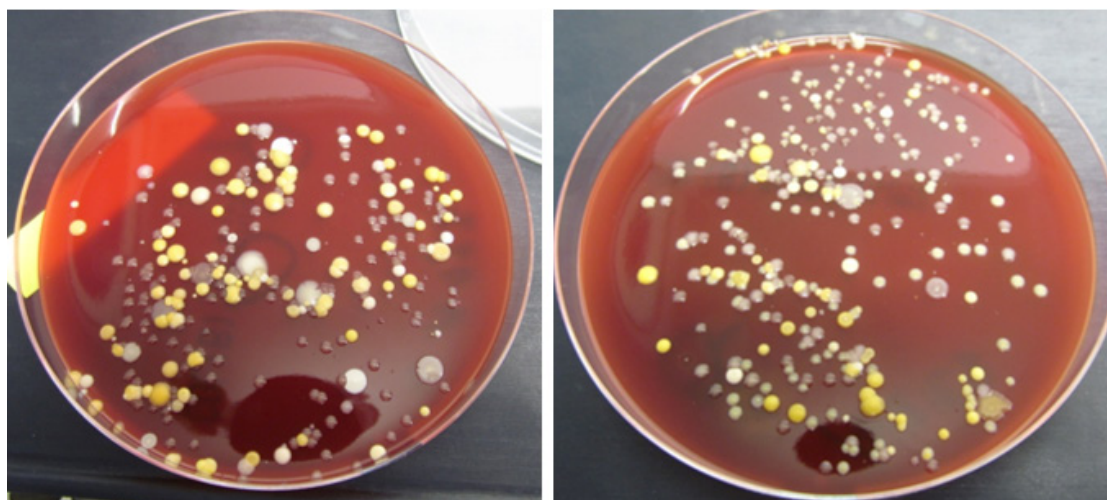


Рис. 7. Суточный посев проб на кровяном агаре, собранных на станции метро «Новокосино» во время утренней пиковой нагрузки. Слева: проба А123, система сбора аэрозоля SASS. Справа: проба А223, система сбора аэрозоля Циклон НИЯУ МИФИ

Таблиця 2. Аналіз зібраних прибором штамів на антибіотикорезистентність

Антибіотик	MT 11 (<i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	MT 12 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	MT 22 (<i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	MT 24 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	MT 8 (<i>Streptococcus viridans</i> ?)
Ампицилін	R	S	S	S	I
Амоксиклав	н/о	н/о	н/о	н/о	R
Цефокситин*	S	S	S	S	н/о
Азитроміцин	S	R	R	S	R
Левовфлоксацин	S	S	R	S	S
Гентаміцин	S	S	S	S	R
Амікацин	S	S	S	S	R
Тетрацилін	S	S	S	S	S
Ванкомицин	S	S	S	S	S
Новобіоцин	S	R	S	S	н/о
Бацитрацин	н/о	н/о	н/о	н/о	R
Оптохін	н/о	н/о	н/о	н/о	R

целесообразным также представляется реализация функции удаленного управления устройством и параметрами отбора по wi-fi сети.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведены расчеты, на основании которых создано устройство для сбора аэрозольных частиц размерами 0,5–5 мкм с высокой объемной скоростью и концентрированием в жидкой фазе. По результатам проведенных испытаний, прибор обеспечивает отбор аэрозолей с объемной скоростью до 4500 л/мин, эффективностью концентрирования до 20% по массе при объемной скорости более 4000 л/мин и до 61% по массе при объемной скорости более 300 л/мин. Диапазон

размеров селективируемых аэрозольных частиц — 0,5–5 мкм, масса виртуального импактора устройства 7,2 кг, масса циклонного коллектора — 5,6 кг. Электропитание — 220 В переменного тока, 24 и 12 В постоянного тока. Устройство выполнено в пылевлагозащищенном корпусе. По достигнутым показателям эффективности прибор соответствует лучшим мировым образцам. При этом более 90% комплектующих деталей прибора — российского производства. Устройство может быть использовано для обеспечения биологической безопасности на транспорте, объектах инфраструктуры, для мониторинга воздушной обстановки на таможенных и пограничных пунктах, экологического наблюдения, а также при оснащении лечебных и научно-исследовательских учреждений Министерства здравоохранения и Министерства обороны Российской Федерации.

Литература

- Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and Occupational Lung Disease. J Aerosol Sci. 1994; 25 (8): 1371–1404.
- Omelianetz G. Biological Hazards as Risks Factors in Microbial Industry. Pharmacol Toxicol Suppl. 1997; (80): 141–145.
- Sigaev G, et al. Development of a Cyclone-based Aerosol Sampler with Recirculating Liquid Film: Theory and Experiment. Aerosol Sci and Tech. 2006; 40 (5): 293–308.
- Henningson EW, Ahlberg MS. Evaluation of Microbiological Aerosol Samplers. A Review. J Aerosol Sci. 1994; (25): 1459–1492.
- Baron PA, Willeke K. Aerosol Fundamentals. In: Baron PA, Willeke K, editors. Aerosol measurement: principles, techniques and applications. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2001. p. 55–60.
- McFarland AR, HYPERLINK "https://www.researchgate.net/profile/Maria_King4" King MD, HYPERLINK "https://www.researchgate.net/profile/John_Haglund2" Haglund JS, HYPERLINK "https://www.researchgate.net/scientific-contributions/21610210_Youngjin_Seo" Seo Y. Wetted Wall Cyclones for Bioaerosol Sampling. Aerosol sampling and technology. 2010; 44 (4): 241–252. DOI: 10.1080/02786820903555552.
- Marple V, Olson B, Rubow K. Inertial gravitational, centrifugal and thermal collection techniques. In: Baron PA, Willeke K, editors. Aerosol measurement: principles, techniques and applications. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2001. p. 229–39.
- Sigaev VI. Novel liquid sampler for aerosols. Abstracts of the 20th annual AAAR Conference; Portland, Oregon. 2001. Abstract 11PG5:406.
- Solomon PA, HYPERLINK "https://www.researchgate.net/profile/Matthew_Landis" Landis MS, HYPERLINK "https://www.researchgate.net/scientific-contributions/71734146_Gary_Norris" Norris G, HYPERLINK "https://www.researchgate.net/scientific-contributions/10776481_Michael_P_Tolocka" Tolocka MP. Chemical analyses methods for atmospheric aerosol components. In: Baron PA, Willeke K, editors. Aerosol measurements: principles, techniques and applications. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2001. p. 261–93
- Saaski E, et al. Concentrator. US Patent 9791353B2. October 2017.
- Saaski E, et al. Liquid particulate extraction device. US Patent 7846228B1. December 2010.
- Marple VA, Liu BYH. Characteristics of laminar jet impactors. Envir Sci Technol. 1974; (7): 648–54.
- Marple V. A fundamental study of inertial impactors [dissertation]. Minneapolis (MN): University of Minnesota; 1970.
- Chen BT, Yeh HC. An improved virtual reactor: design and performance. J Aerosol Sci. 1987; 18 (2): 203–14.

References

1. Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and Occupational Lung Disease. *J Aerosol Sci.* 1994; 25 (8): 1371–1404.
2. Omelianetz G. Biological Hazards as Risks Factors in Microbial Industry. *Pharmacol Toxicol Suppl.* 1997; (80): 141–145.
3. Sigaev G, et al. Development of a Cyclone-based Aerosol Sampler with Recirculating Liquid Film: Theory and Experiment. *Aerosol Sci and Tech.* 2006; 40 (5): 293–308.
4. Henningson EW, Ahlberg MS. Evaluation of Microbiological Aerosol Samplers. A Review. *J Aerosol Sci.* 1994; (25): 1459–1492.
5. Baron PA, Willeke K. Aerosol Fundamentals. In: Baron PA, Willeke K, editors. *Aerosol measurement: principles, techniques and applications.* 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2001. p. 55–60.
6. McFarland AR, [HYPERLINK "https://www.researchgate.net/profile/Maria_King4"](https://www.researchgate.net/profile/Maria_King4) King MD, [HYPERLINK "https://www.researchgate.net/profile/John_Haglund2"](https://www.researchgate.net/profile/John_Haglund2) Haglund JS, [HYPERLINK "https://www.researchgate.net/scientific-contributions/21610210_Youngjin_Seo"](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/21610210_Youngjin_Seo) Seo Y. Wetted Wall Cyclones for Bioaerosol Sampling. *Aerosol sampling and technology.* 2010; 44 (4): 241–252. DOI: 10.1080/02786820903555552.
7. Marple V, Olson B, Rubow K. Inertial gravitational, centrifugal and thermal collection techniques. In: Baron PA, Willeke K, editors. *Aerosol measurement: principles, techniques and applications.* 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2001. p. 229–39.
8. Sigaev VI. Novel liquid sampler for aerosols. Abstracts of the 20th annual AAAR Conference; Portland, Oregon. 2001. Abstract 11PG5:406.
9. Solomon PA, [HYPERLINK "https://www.researchgate.net/profile/Matthew_Landis"](https://www.researchgate.net/profile/Matthew_Landis) Landi MS, [HYPERLINK "https://www.researchgate.net/scientific-contributions/71734146_Gary_Norris"](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/71734146_Gary_Norris) Norris G, [HYPERLINK "https://www.researchgate.net/scientific-contributions/10776481_Michael_P_Tolocka"](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/10776481_Michael_P_Tolocka) Tolocka MP. Chemical analyses methods for atmospheric aerosol components. In: Baron PA, Willeke K, editors. *Aerosol measurements: principles, techniques and applications.* 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2001. p. 261–93.
10. Saaski E, et al. Concentrator. US Patent 9791353B2. October 2017.
11. Saaski E, et al. Liquid particulate extraction device. US Patent 7846228B1. December 2010.
12. Marple VA, Liu BYH. Characteristics of laminar jet impactors. *Envir Sci Technol.* 1974; (7): 648–54.
13. Marple V. A fundamental study of inertial impactors [dissertation]. Minneapolis (MN): University of Minnesota; 1970.
14. Chen BT, Yeh HC. An improved virtual reactor: design and performance. *J Aerosol Sci.* 1987; 18 (2): 203–14.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО СТЕНДА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АЭРОЗОЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ

Д. А. Клейменов¹✉, Б. И. Вердиев¹, А. А. Ененко², В. А. Гушчин^{1,3,4}, А. П. Ткачук¹

¹ Лаборатория трансляционной биомедицины,

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

² ЗАО Ламинарные системы, Миасс, Челябинская обл.

³ Лаборатория механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов,

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

⁴ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Для обеспечения безопасности проживающих в условиях города людей необходимо контролировать воздушную среду населенных пунктов и прежде всего мегаполисов на наличие патогенных биологических агентов (ПБА). Разрабатываются различные системы контроля биологического состава воздушной среды (сбор и анализ аэрозоля) и ее очистки (фильтрация, дезинфекция). Возможность экспериментального создания аэрозолей заданного состава является необходимым условием разработки любых подобных устройств. Рабочий объем большинства установок для работы с аэрозолями, имеющихся в России, достигает нескольких сотен литров, что недостаточно. Специальные аэрозольные камеры с большим рабочим объемом (10–20 м³) характеризуются высокой стоимостью и требуют проведения капитального строительства/реконструкции помещений для их установки. В настоящей работе представлен аналитический стенд для индикации маркеров ПБА в контролируемых условиях, разработанный на основе специального варианта бокса БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01), главным назначением которого является проведение тестов и испытаний приборов для сбора и/или анализа аэрозолей модельных биопатогенов. Устройство предназначено для проведения исследований начального и среднего уровня с большинством ПБА III группы патогенности внутри отдельной лаборатории. Внешние размеры позволяют устанавливать его в помещениях площадью от 10 м² при достаточном внутреннем объеме камеры для проведения испытаний (более 4 м³).

Ключевые слова: инфекционные заболевания, аэрозольные инфекции, сбор аэрозоля, аэрозольный стенд

Финансирование: статья подготовлена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках программы «Национальная система химической и биологической безопасности 2015–2020» и Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Александрович Клейменов
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; 10000let@rambler.ru, denis.a.kleymenov@gamaleya.org

Статья получена: 06.08.2018 **Статья принята к печати:** 31.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.053

PERFORMANCE OF THE ORIGINAL WORKSTATION FOR AEROSOL TESTS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Kleymenov DA¹✉, Verdiev BI¹, Enenko AA², Gushchin VA^{1,3,4}, Tkachuk AP¹

¹ Laboratory of Translational Biomedicine,

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

² ZAO Laminar Systems, Miass, Chelyabinsk oblast

³ Laboratory of Population Variability Mechanisms in Pathogenic Microorganisms,

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

⁴ Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Air quality monitoring is essential when it comes to protecting the urban population, especially that of big metropolises, from biohazards including biopathogens (BPs). This process is aided by different samplers and analyzers of aerosol pollutants, filters and disinfection systems. Their performance is tested using experimental aerosol formulations with a predetermined composition. Unfortunately, the majority of such systems available in Russia are only able to process a few hundred liters of air per time unit, which is too little. Big aerosol chambers (10 to 20 m³) are very expensive and may not fit into a lab, necessitating an extensive overhaul. In this work we present a workstation for the detection of BP markers under controlled conditions based on the microbiological safety box MSB-III-Laminar-C-1.5 (380.150.01) that was originally designed to test the performance of samplers and analyzers of experimental aerosol formulations. Our workstation can handle the majority of BSL-1-2 BPs and, given the chamber volume that satisfies the requirements of aerosol experiments (> 4 m³), can be installed in a lab with an area of >10 m².

Keywords: infection, aerosol, aerosol sampling, aerosol chamber

Funding: this work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation as part of the project *The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020)* and by the Ministry of Education and Science as part of the project RFMEFI60117X0018.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis A. Kleymenov
Gamalei 18, Moscow, 123098; 10000let@rambler.ru, denis.a.kleymenov@gamaleya.org

Received: 06.08.2018 **Accepted:** 31.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.053

Исследование воздуха на наличие биопатогенов приобретает все большую актуальность. В разнообразие естественных источников микроорганизмов вносит свой вклад развитие биотехнологии, а именно загрязнение от применения генно-инженерных штаммов в производстве

фармацевтических препаратов и субстанций [1]. Антропогенный городской ландшафт и агропромышленные зоны способствуют образованию благоприятных локальных условий для развития популяций бактерий и вирусов, ареалом жизнедеятельности которых становятся места

общественного пользования (больницы, роддома, метрополитен и др.), технологические сети (вентиляция, водопровод, стоки и др.), а также животные и среда их обитания. Высокая плотность и мобильность современного городского населения способствуют появлению риска широкого распространения форм заболеваний с аэрозольным механизмом передачи возбудителя [2]. Весьма актуальной остается проблема биотерроризма [3, 4].

Для контроля за обсемененностью воздуха сеществует множество современных технических средств, позволяющих проводить сбор аэрозоля из воздуха, а также анализ количества и размера аэрозольных частиц и их потенциальной принадлежности к биопатогенам. Отработка технических решений для получения необходимых характеристик требует создания искусственных аэрозолей, моделирующих естественную среду и возможные отклонения при их применении. Современные фильтры высокой эффективности позволяют создать аналитический стенд в виде камеры с изолированным объемом, устанавливаемый внутри лабораторного помещения, гарантирующего безопасную работу с аэрозолями и биопатогенами в аэрозольной форме [5, 6].

Основные параметры, которым должна удовлетворять камера: внутренний объем, достаточный для размещения приборов; удобный доступ; внешние габариты, позволяющие устанавливать камеру в помещении лабораторного бокса; обеспечение фильтрации воздуха на входе и на выходе; распределение аэрозоля равномерно по всему объему; простота очистки и деконтаминации. Современные боксы микробиологической безопасности III класса (БМБ-III) соответствуют большинству условий, за исключением требований к внутреннему объему [6].

I. Дизайн эксперимента

С целью создания испытательного аналитического стенда для индикации маркеров патогенных биологических агентов в контролируемых условиях был разработан специальный вариант бокса БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01), главным назначением которого является проведение тестов и испытаний приборов для сбора и/или анализа аэрозолей модельных биопатогенов.

Опытный образец отечественного высокопроизводительного аэрозольного пробоотборника с рециркуляцией жидкой фазы и предварительным концентрированием, разработанный в Национальном исследовательском ядерном университете МИФИ (НИЯУ МИФИ), служил для сбора частиц размером более 0,5 мкм при объемных скоростях пробоотбора выше 4000 л/мин. Ближайшим аналогом для сравнения была использована система SASS4000/2300 (Research International Inc., США).

Рассмотрим подробнее основные этапы разработки аналитического стенда и его испытания для индикации патогенов.

II. Подготовительные этапы

1. Оборудование

1.1. Аналитический стенд для индикации маркеров патогенных биологических агентов в контролируемых условиях.

Бокс БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01) (Ламинарные системы; Россия) представляет собой бокс микробиологической безопасности III класса специфичной конструкции

по ГОСТ Р ЕН 12469-2010 с герметичной внутренней камерой размерами 1,5 × 1,5 × 1,9 м (рис. 1). В рабочую камеру непрерывно подается воздух, предварительно прошедший через приточный высокоэффективный HEPA-фильтр класса H14, вследствие чего имеется возможность создавать внутри рабочей камеры чистую воздушную среду с классом чистоты по частицам более 0,5 мкм вплоть до 5 ИСО по ГОСТ ИСО 14644-1-2002. Удаление воздуха происходит через каскад двух последовательно установленных выпускных HEPA-фильтров класса H14. Движение воздуха внутри бокса обеспечивается путем создания разряжения выпускными вентиляторами, причем разряжение внутри рабочей камеры бокса составляет не менее 250 Па относительно помещения установки. Полный поток воздуха через бокс составляет 800 м³/ч, однако может быть уменьшен до нуля за счет совместного регулирования скорости вращения вытяжных вентиляторов и специальной дроссельной заслонки, изменяющей аэродинамическое сопротивление приточного тракта бокса. В результате воздух, содержащий создаваемый внутри рабочей камеры аэрозоль, очищается, проходя через каскад выпускных HEPA-фильтров, и попадает обратно в помещение установки. Вследствие непрерывного наличия внутри рабочей камеры бокса разряжения в 250 Па выход аэрозольных частиц за пределы бокса сведен к минимуму, определяемому только конечной эффективностью каскада HEPA-фильтров. Вследствие конструктивных особенностей бокса воздухопроводы, по которым движется контаминированный воздух, отсутствуют и воздух из рабочей камеры сразу попадает на выпускные HEPA-фильтры первой ступени.

Загрузка испытательного оборудования внутрь рабочей камеры осуществляется через герметизируемую полноразмерную дверь. Плотность прилегания стеклянной поверхности двери к дверному уплотнителю обеспечивается за счет использования специальных двусосных петель и четырех рукояток тугого прижима двери.

Контроль параметров воздушной среды производится с помощью комплекса измерительного оборудования, подключаемого через проходную технологическую панель. Связь диагностического и измерительного оборудования с компьютером осуществляется через специальную проходную панель, содержащую как герметизированные воздушные штуцеры, так и проходные электрические соединения.

Управление режимами работы бокса осуществляется через сенсорную панель оператора. Система управления бокса устроена таким образом, чтобы в автоматическом режиме поддерживать заданный расход воздуха и разряжение внутри рабочей камеры, а также сигнализировать обо всех нештатных ситуациях при работе бокса. Автоматика также способна отслеживать засоренность HEPA- и предварительного фильтров и компенсировать изменения их аэродинамического сопротивления за счет изменения скорости вращения вентиляторов и положения дроссельной заслонки.

Дезинфекционная обработка бокса осуществляется с учетом требований нормативных документов, а также технологического процесса проведения исследований. Для первичной дезинфекции внутри рабочей камеры установлена пара УФ-ламп. Для полной деконтаминации рабочей камеры можно применять такие методы, как деконтаминация парами формалина либо пероксида водорода. Подключение оборудования можно производить через специальные проходные штуцеры диаметром 38 мм.

1.2. Аэрозольный пробоотборник (НИЯУ МИФИ; Россия)

Устройство состоит из виртуального импактора, соединенного воздуховодом с циклонным коллектором (рис. 2). В основе работы лежит двухступенчатое последовательное концентрирование, что позволяет достигать больших объемных скоростей прокачки (4000 л/мин). На первой ступени осуществляется концентрирование частиц при прокачке через щелевой виртуальный импактор. Выходной воздушный поток (300 л/мин), содержащий концентрированные частицы, поступает в циклонный коллектор (вторая ступень). Вторая ступень включает в себя осаждение концентрированных частиц в пленке жидкости, непрерывно циркулирующей в циклонном коллекторе. Увеличение времени циркуляции при продолжающемся поступлении частиц приводит к возрастанию их концентрации в жидкой фазе. Объем жидкого образца на выходе 7–8 мл.

1.3. Аэрозольный пробоотборник SASS 4000/2300 (Research International Inc.; США)

Аэрозольный пробоотборник SASS 4000/2300 по принципу работы аналогичен устройству НИЯУ МИФИ. На первой ступени виртуальный щелевой импактор имеет объемную скорость прокачки 3600 л/мин. На второй ступени циклонный коллектор обеспечивает воздушный поток со

скоростью 325 л/мин и объем выдаваемой жидкой пробы 4–5 мл.

1.4. Портативный аэрозольный счетчик частиц SOLAIR 3100 (Lighthouse Worldwide Solutions; США)

Используется для тестирования целостности приточного и выпускных HEPA-фильтров. Измерения проводили в шести диапазонах 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 мкм.

1.5. Аэрозольный счетчик субмикронных частиц 4705 (AeroNanoTech; Россия)

Портативный аэрозольный счетчик субмикронных частиц используется для замера концентрации частиц и их распределения по размерам в субмикронном диапазоне. С помощью прибора измеряли счетную концентрацию в диапазонах 1; 2; 3; 5; 10 мкм.

III. Тестирование

1. Проверка целостности HEPA-фильтров (тест №1)

Проверку проводили перед вводом в эксплуатацию оборудования в соответствии с ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007 [7]. Испытания выполняли путем подачи контрольного

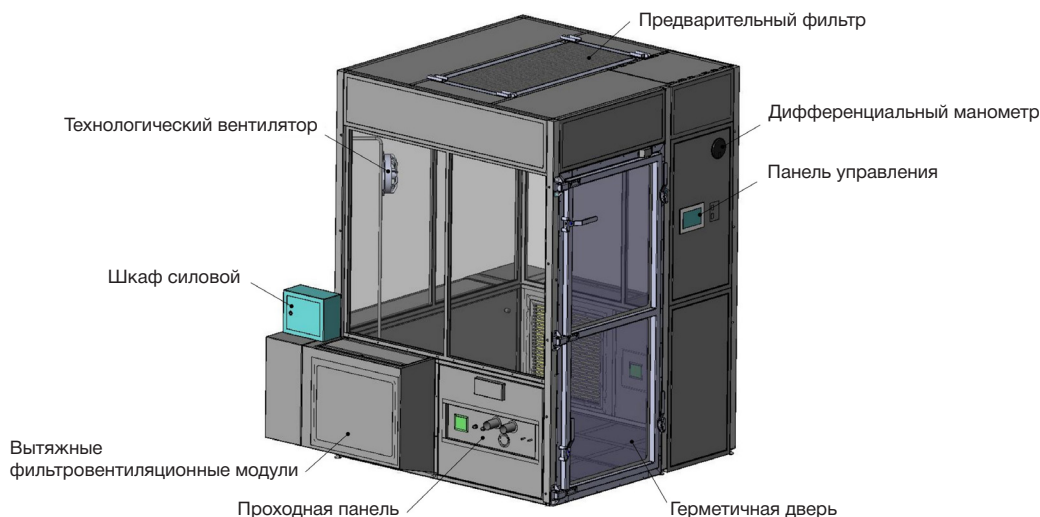


Рис. 1. Внешний вид бокса БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01)



Рис. 2. Внешний вид аэрозольного пробоотборника (НИЯУ МИФИ; Россия)

аэрозоля на вход фильтров и одновременного сканирования счетчиком частиц SOLAIR 3100 поверхности фильтров и их креплений или осуществления отбора пробы после фильтров в воздуховоде.

2. Исследование скорости и эффективности очистки воздуха (тест №2). Тест на эффективность сбора частиц аэрозольным пробоотборником НИЯУ МИФИ.

Исследование проводили в рамках нескольких режимов работы аэрозольного бокса путем распыления внутри него компрессорным небулайзером Comp Air NE-C28 (Omron Healthcare Co., Ltd.; Япония) раствора 10% сахарозы в дистиллированной воде и измерением на фоне этого количества частиц размером 1, 3 и 5 мкм также внутри бокса аэрозольным счетчиком субмикронных частиц 4705. Исследование проводили в трех режимах работы бокса. Перед началом исследования на любом из режимов на фоне включенной системы перемешивания воздуха (технологические вентиляторы, обеспечивавшие равномерное распределение частиц по объему; рис. 1) с помощью системы очистки (выпускные HEPA-фильтры) добивались чистоты воздуха, характеризующейся наличием 0–1 частицы (0–353 частиц/м³) диаметром 1, 3, 5, 10 мкм по данным счетчика. Далее систему очистки (но не вентиляторы) отключали. Включали счетчик (представленные на рис. 3 данные получены начиная с этого момента), который при постоянном измерении количества частиц выдавал среднее их значение за 1 мин в течение 16 мин. Одновременно с включением счетчика начинали распыление раствора сахарозы в течение 5 мин. Затем распыление прекращали. Первый режим (оседание частиц без перемешивания): технологические вентиляторы отключены, система очистки включена, измерение числа частиц в течение 11 мин. Второй режим (оседание частиц с перемешиванием): технологические вентиляторы включены, система очистки отключена, измерение числа частиц в течение 11 мин. В этом режиме также отдельно проводили измерение числа частиц на фоне работы аэрозольного пробоотборника НИЯУ МИФИ. Третий режим (очистка воздуха от частиц с перемешиванием): технологические вентиляторы включены, система очистки включена, измерение числа частиц в течение 11 мин.

3. Сравнительный тест на эффективность сбора аэрозоля двумя пробоотборниками (тест №3)

Определение эффективности сбора полидисперсного аэрозоля проводили путем распыления ультразвуковым небулайзером раствора 10% сахарозы в дистиллированной воде с добавлением красителя флуоресцеина натрия в конечной концентрации 1 мкМ. Раствор готовили в объеме, достаточном для проведения всего цикла испытаний (100 мл). Детекцию интенсивности флуоресценции собранного красителя проводили на флуориметре Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen; США) в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) при возбуждении на длине волны 470 нм и эмиссии 510–580 нм в пробирках объемом 0,6 мл (SSI; США) в карбонатном буфере с pH 9,6 (C3041; Sigma; Германия).

Все испытания в камере аналитического стенда проводили при включенных технологических вентиляторах. Каждое испытание начинали с очистки воздуха в камере аналитического стенда при предварительном включении вентиляции за 15 мин (чтобы убрать частицы из объема камеры) и дальнейшего промывания циклона

в автоматическом режиме при включенном импакторе. После окончания промывания циклона производили контрольный сбор пробы в течение 6 мин. Из полученной пробы брали на анализ 270 мкл, смешивали с 30 мкл десятикратного карбонатного буфера (pH 9,6) (C3041; Sigma; Германия) и проводили исследование уровня флуоресценции. Уровень флуоресценции не должен превышать фоновое значение флуоресценции пустых пробирок. Если значение оказывалось выше, проводили повторный цикл промывания циклона. При достижении минимального фонового свечения вентиляцию в камере отключали.

Генерацию аэрозоля проводили компрессорным небулайзером Comp Air NE-C28 в течение 5 мин. Перед каждым испытанием генератор аэрозоля отмывали и насухо вытирали безворсовой тканью. Заправляли 4 мл раствора сахарозы с флуоресцеином натрия. Одновременно с генератором аэрозоля на 6 мин включали аэрозольный пробоотборник, целиком помещенный в камеру. Таким образом, сбор аэрозоля продолжали в течение 1 мин после остановки генератора аэрозоля. Полученную пробу забирали на анализ и проводили цикл промываний, как указано выше.

Было проведено по пять повторов эксперимента для каждого из аэрозольных пробоотборников.

IV. Результаты испытания аналитического стенда

При вводе камеры в эксплуатацию в соответствии с ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007 был проведен контроль технического состояния прибора, в рамках которого выполнена проверка целостности установленных HEPA-фильтров [7].

Результаты проверки (табл. 1) подтверждают целостность и работоспособность фильтров в соответствии со своим классом H14.

Скорость и эффективность очистки воздуха внутри камеры продемонстрирована на рис. 3. Графики А, В, Д выполнены в линейном формате шкалы ординат, дублируют графики Б, Г, Е, сделанные соответственно с использованием логарифмической шкалы ординат, но без третьего режима, и демонстрируют вклад технологических вентиляторов в работу бокса. За 11 мин исследования после распыления (см. график) при включенной системе очистки число частиц размером 1–5 мкм снизилось до единичных значений в течение 3–6 мин. Без фильтрации воздуха число частиц снижается гораздо медленнее особенно при выключенных технологических вентиляторах. Частицы по всей видимости оседают на внутренних поверхностях бокса. При включенной системе очистки достаточно 10 мин для полного очищения воздуха от частиц диаметром 1–5 мкм, распыляемых в соответствии с описанными выше условиями.

Аэрозольный пробоотборник НИЯУ МИФИ на фоне работы технологических вентиляторов с выключенной системой очистки воздуха за 7 мин работы собирал 92–99% пылевых частиц относительно количества, измеренного до начала сбора, но разное количество частиц на старте измерений (1 мкм — десятки миллионов, 3 мкм и 5 мкм — миллионы) здесь не учтено (табл. 2).

Результаты сравнения эффективности сбора полидисперсного аэрозоля по интенсивности трейсерного красителя представлены в табл. 3. Приведенные значения ОЕФ были нормированы на объем выдаваемой жидкой пробы для каждого устройства. Опытный образец отечественного аэрозольного пробоотборника НИЯУ МИФИ в среднем обеспечивает сбор на уровне системы

SASS, разница по t -критерию Стьюдента является статистически недостоверной по результатам 5 измерений ($p > 0,05$). Проведение 4 циклов промывания при включенной вентиляции в камере аналитического стенда оказалось достаточным для каждого прибора, чтобы флюоресценция красителя не детектировалась.

V. Обсуждение результатов эксперимента

Изучение свойств ПБА в воздушной среде осложнено необходимостью учитывать и минимизировать влияние на результаты исследования ряда специфических факторов. Прежде всего распыление ПБА в атмосфере, особенно ПБА с аэрозольным механизмом передачи, требует исключить воздействие этих агентов как на людей, так и на объекты окружающей среды, т. е. распыление необходимо делать в полностью изолируемых помещениях, отсеках, блоках. Такие помещения должны полностью ограничивать и защищать остальное пространство от объекта изучения, в них должна быть предусмотрена возможность быстрой и безопасной очистки воздуха от объекта предыдущего эксперимента, а также дезинфекции, и они должны отвечать требованиям официальных документов (государственных стандартов, санитарных правил и др.), регламентирующих обусловленное безопасностью устройство таких конструкций. Наконец, в эпоху высоких технологий такие конструкции должны быть созданы из высокотехнологичных и экологически безопасных материалов, а также должны быть оснащены различными датчиками (давления, температуры, скорости движения и чистоты воздуха и

др.) и электронными устройствами ввода информации и управления прибором [8–10].

Учет всех перечисленных факторов при создании конечного продукта, а также его уникальность (продукт не для массового использования) обуславливают достаточно внушительную стоимость для заказчика.

Для проведения описываемых работ в центрах коллективного пользования научным оборудованием в составе крупных специализированных учреждений РФ созданы установки для медико-биологических исследований. В качестве примера здесь приводится стенд аэрозольный испытательный статико-динамический, созданный на базе Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения (НИИБП), который «предназначен для проверки основных технических характеристик средств системы биологической безопасности и противодействия терроризму при контроле окружающего воздуха в динамических и статических условиях при температурах (от минус 20 до плюс 40 °C) и относительной влажности (от 30 до 95%) воздуха» [11]. Столь крупная конструкция (объем статических камер 8 и 26 м³) является примером идеального места для изучения аэрозольных ПБА и микроорганизмов, однако в настоящий момент в НИИБП отсутствует возможность работы с патогенами 3–4 группы, что ограничивает спектр тестируемых биоаэрозолей только имитаторами. Вести в таком учреждении научные исследования на постоянной основе представляется не очень удобным — скорее серию экспериментов, а строительство подобного объекта на собственной территории представляется довольно затратным.

Таблица 1. Проверка целостности НЕРА-фильтров, входящих в конструкцию оборудования

НЕРА-фильтр	Результат измерения числа частиц диаметром 0,3 мкм до фильтра (N_c)	Концентрация аэрозольных частиц до фильтра C_c (частиц/см³) $C_c = \frac{N_c}{q_{vs} \cdot T_{stat}} \cdot dil$	Результат измерения числа частиц диаметром 0,3 мкм и более после фильтра	Верхнее референсное значение числа частиц диаметром 0,3 мкм и более за время сканирования после НЕРА-фильтра (N_{scan}) $N_{scan} \leq C_c \cdot P_{int} \cdot q_{vs} \cdot T_{scan}$	Флаг
Приточный	50109	1061	130	≤ 18779	Не превышено
Выпускной первой ступени очистки	91343	1935	4493	≤ 13701	Не превышено
Выпускной второй ступени очистки	49624	1051	281	≤ 18602	Не превышено
q_{vs}	скорость пробоотбора счетчика частиц согласно его паспорту = 472 см³/с				
dil	коэффициент разбавления пробы дилутором согласно его паспорту = 100				
T_{stat}	рекомендуемое время стационарного измерения = 10 с				
P_{int}	допускаемый интегральный коэффициент проскока установленных НЕРА-фильтров согласно ГОСТ Р ИСО 14644–3–2007 = 0,00025				
T_{scan}	время отбора пробы = 150 с, 60 с, 150 с соответственно				

Таблица 2. Интенсивность сбора пылевых частиц разного диаметра аэрозольным пробоотборником НИЯУ МИФИ

Время от начала эксперимента (мин)	1 мкм		3 мкм		5 мкм	
5	56829268	100%	6700900	100%	1289540	100%
7	41036585	72%	3322200	50%	555680	43%
8	21097561	37%	1062200	16%	160966	12%
10	11707317	21%	497200	7%	51038	4%
11	6951220	12%	265550	4%	17032,8	1%
12	4512195	8%	172890	3%	6402,4	0,5%

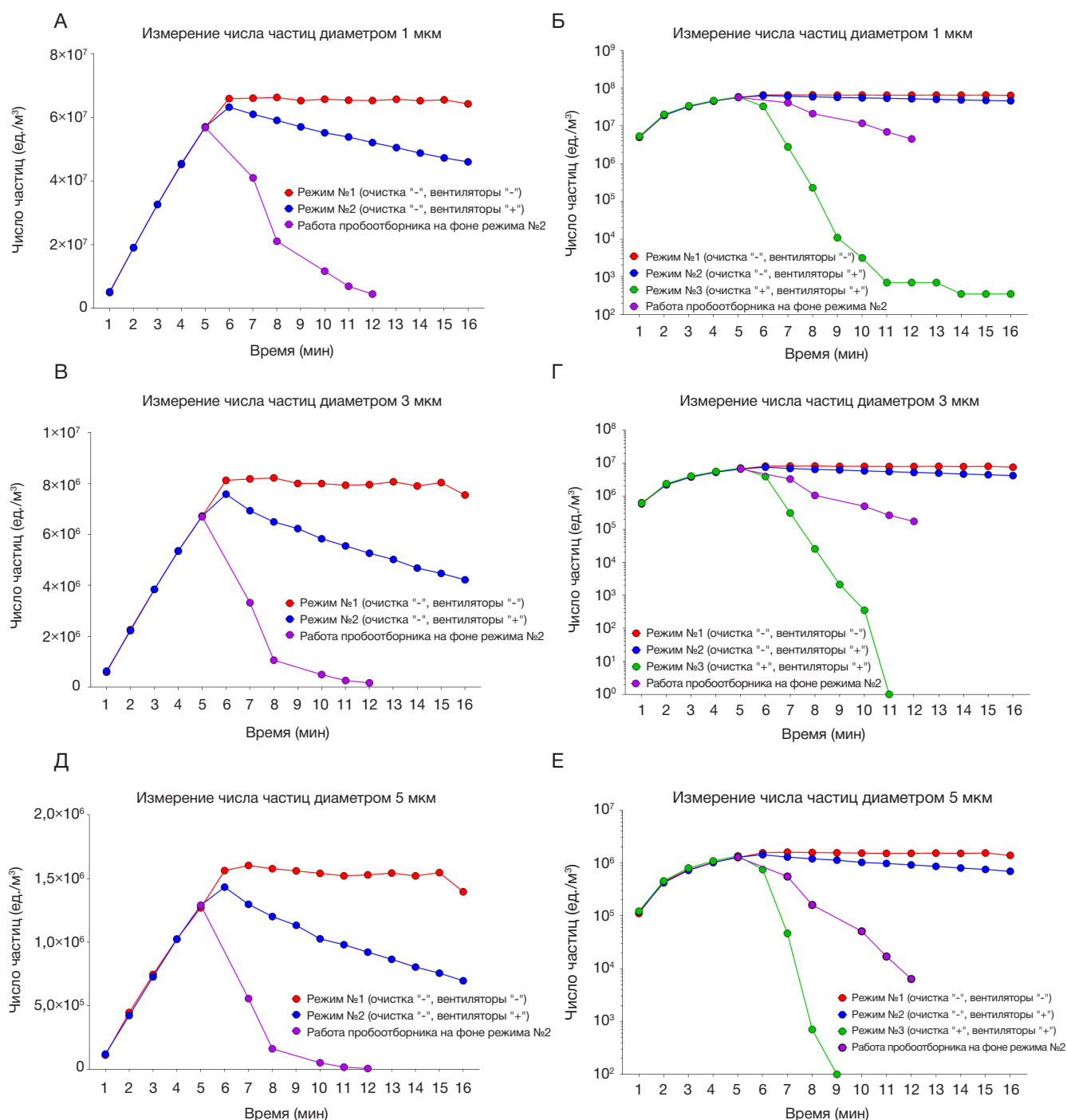


Рис. 3. Динамика очистки воздуха бокса БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 от частиц 1–5 мкм (А–Е) после 5 мин распыления с учетом работы технологических вентиляторов и установленной системы очистки

Более доступные варианты представлены на рынке различными БМБ III класса, которые защищают оператора и окружающую среду от заражения аэрозолями, возникающими при работе с ПБА, в том числе высших (особо опасных) групп патогенности, а также защищают рабочие агенты внутри рабочей камеры от внешней контаминации. Эти конструкции предназначены для решения определенных задач обычно с одним-двумя рабочими местами и с небольшим внутренним рабочим объемом до 1 м³.

Промежуточным вариантом из приведенных нам представляется описанный и апробированный в работе бокс БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01), главным назначением которого является проведение тестов и испытаний приборов для сбора аэрозолей модельных

биопатогенов и/или их анализа. Установленные в конструкцию современные НЕРА-фильтры класса H14 задерживают более 99,995% всех частиц величиной более 0,3 мкм [12]. Созданные изначально для фильтрации воздуха от радиоактивных частиц с эффективностью не менее 99,97% такие фильтры имеют некоторые ограничения. Так, основные (но не все) бактерии имеют размеры от 0,4 (*Proteus mirabilis*) до 10 мкм (*Clostridium perfringens*), а патогенные грибы от 1 (*Pneumocystis jirovecii*) до 20 мкм (*Fusarium sp.*). Вирусы же «располагаются» в диапазоне от 0,02 (*Rhinovirus*) до 0,3 (*Mumps virus*) мкм [13]. Кроме того, инфекционная доза некоторых патогенов чрезвычайно мала и составляет, например для возбудителя Ку-лихорадки *Coxiella burnetii*, менее десяти

Таблица 3. Сравнение эффективности сбора полидисперсного аэрозоля

Аэрозольный пробоотборник	Средний объем пробы (мл)	Среднее ОЕФ/мл с погрешностью	Относительно SASS (%)
НИЯУ МИФИ	7,5	1441 ± 98	97,7
SASS	4,5	1475 ± 122	100

бактерий, которые вполне могут войти в число тех 0,005%, проскакивающих через фильтр при гипотетическом опыте с распылением этой бактерии в боксе в количестве 10^7 КОЕ и выше [14]. Исследования НЕРА-фильтров с использованием фага MS2 показали прямую зависимость эффективности фильтрации от скорости воздушного потока [15]. Таким образом, при выборе подобного оборудования необходимо учитывать специфику стоящих перед исследователем задач. Конструктивное исполнение бокса БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01) с двухкаскадной фильтрацией на выходе (расчетное значение на проскок частиц при такой конфигурации составляет $3 \times 10^{-9}\%$) и активной регуляцией для поддержания оптимальной скорости воздушного потока обеспечивает достаточный уровень защиты при работе с концентрациями ПБА 10^6 – 10^7 КОЕ/м³. Результаты оценки целостности и работоспособности фильтров (см. табл. 1), соответствующие требованиям официальных регламентирующих документов, указывают на допустимость использования бокса для решения большинства стандартных задач.

Исследование на скорость и эффективность очистки воздуха внутри бокса от частиц основных исследуемых размеров (1, 3 и 5 мкм) показало, что после распыления при выключенных системе очистки и технологических вентиляторах концентрация частиц в воздухе бокса

остается практически неизменной в течение достаточно длительного времени — 11 мин. При включенной системе технологических вентиляторов (принудительное перемешивание) в течение того же времени отмечалось объяснимое, но незначительное снижение концентрации частиц во всех трех диапазонах. Система очистки продемонстрировала высокую скорость и эффективность, удалив из воздуха примеси за период от 3 до 6 мин в зависимости от размера и количества распыленных частиц. В тесте №3 бокс позволил оценить некоторые характеристики прибора для сбора аэрозоля, разработанного в НИЯУ МИФИ, в сравнении с импортным аналогом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бокс БМБ-III-«Ламинар-С»-1,5 (380.150.01) является высококачественным продуктом для проведения аэрозольных исследований внутри отдельной лаборатории, с характеристиками биологической (микробиологической) безопасности III класса. Объем его рабочей камеры 4,275 м³ позволяет проводить аэрозольные исследования начального и среднего уровня с большинством ПБА, например по оценке и настройке устройств для сбора аэрозолей, изменений биологических аэрозолей в разных концентрациях в статическом и динамическом режиме.

Литература

- Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and Occupational Lung Disease. *J Aerosol Sci.* 1994; 25 (8): 1371–404.
- Li Y, Leung GM, Tang JW, et al. Role of Ventilation in Airborne Transmission of Infectious Agents in the Built Environment — a Multidisciplinary Systematic Review. *Indoor Air.* 2007; (17): 2–18.
- Tu AT, Aum Shinrikyo's Chemical and Biological Weapons: More Than Sarin. *Forensic Sci Rev.* 2014; 26 (2): 115–20.
- Schep LJ, Temple WA, Butt GA, Beasley MD. Ricin as a weapon of mass terror—separating fact from fiction. *Environ Int.* 2009; 35 (8): 1267–71.
- СП 1.3.1285-2003. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Минюст РФ. Рег. ном. 4545 (15 мая 2003).
- ГОСТ Р ЕН 12469-2010. Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности. Росстандарт. Рег. ном. 1144-ст (29 декабря 2010).
- ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 3. Методы испытаний. Росстандарт. Рег. ном. 616-ст (27 декабря 2007).
- Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2014. 195 с.
- Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней: Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 (с изменениями на 29 июня 2011 года). Доступно по ссылке: <http://docs.cntd.ru/document/902091086>
- Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения N 1 к СП 1.3.2322-08. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2518-09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 8 с.
- Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации. Центры коллективного пользования научным оборудованием и уникальные научные установки. Доступно по ссылке: <http://ckp-rf.ru/usu/73550/lamsys.ru> [internet]. ЗАО "Ламинаторные системы" Доступно по ссылке: <http://www.lamsys.ru/nera.php>
- Kowalski W. Hospital Airborne Infection Control. CRC Press. 2012; p. 42–48.
- EJ van Schaik, C. Chen, K. Mertens, MM Weber, JE Samuel. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11 (8): 561–73.
- Heimbuch BK, Hodge JE, Wander JD. Viral Penetration of High Efficiency Particulate Air (HEPA) Filters. 5th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting; 2007 27 Feb – 2 Mar; Washington DC. Available from: https://www.researchgate.net/publication/235151297_Viral_Penetration_of_High_Efficiency_Partuculate_Air_HEPA_Filters

References

- Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and Occupational Lung Disease. *J Aerosol Sci.* 1994; 25 (8): 1371–404.
- Li Y, Leung GM, Tang JW, et al. Role of Ventilation in Airborne Transmission of Infectious Agents in the Built Environment — a

- Multidisciplinary Systematic Review. *Indoor Air*. 2007; (17): 2–18.
3. Tu AT. Aum Shinrikyo's Chemical and Biological Weapons: More Than Sarin. *Forensic Sci Rev*. 2014; 26 (2): 115–20.
4. Schep LJ, Temple WA, Butt GA, Beasley MD. Ricin as a weapon of mass terror--separating fact from fiction. *Environ Int*. 2009; 35 (8): 1267–71.
5. SP 1.3.1285-2003. Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami I-II grupp patogennosti (opasnosti). Minjust RF. Reg. nom. 4545 (15 maja 2003).
6. GOST R EN 12469-2010. Biotehnologija. Tehnicheskie trebovaniya k boksam mikrobiologicheskoy bezopasnosti. Rosstandart. Reg. nom. 1144-st (29 dekabrya 2010).
7. GOST R ISO 14644-3-2007. Chistye pomescheniya i svyazannyye s nimi kontroliruyemye sredy. Chast' 3. Metody ispytaniy. Rosstandart. Reg. nom. 616-st (27 dekabrya 2007).
8. Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami I-II grupp patogennosti (opasnosti): Sanitarno-jepidemiologicheskie pravila SP 1.3.3118-13. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora; 2014. 195 s.
9. Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami III-IV grupp patogennosti (opasnosti) i vzbuditeljami parazitarnyh boleznej: Sanitarno-jepidemiologicheskie pravila SP 1.3.2322-08 (s izmeneniyami na 29 ijunya 2011 g). Dostupno po ssylke: <http://docs.cntd.ru/document/902091086>
10. Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami III-IV grupp patogennosti (opasnosti) i vzbuditeljami parazitarnyh boleznej. Dopolneniya i izmeneniya N 1 k SP 1.3.2322-08. Sanitarno-jepidemiologicheskie pravila SP 1.3.2518-09. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora; 2009. 8 s.
11. Nauchno-tehnologicheskaja infrastruktura Rossijskoj Federacii. Centry kolektivnogo pol'zovaniya nauchnym oborudovaniem i unikal'nye nauchnye ustanovki. Dostupno po ssylke: <http://ckp-rf.ru/usu/73550/>
12. lamsys.ru [internet]. ZAO "Laminarnyye sistemy" Dostupno po ssylke: <http://www.lamsys.ru/nera.php>
13. Kowalski W. Hospital Airborne Infection Control. CRC Press. 2012; p. 42–48.
14. EJ van Schaik, C. Chen, K. Mertens, MM Weber, JE Samuel. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11 (8): 561–73.
15. Heimbuch BK, Hodge JE, Wander JD. Viral Penetration of High Efficiency Particulate Air (HEPA) Filters. 5th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting; 2007 27 Feb–2 Mar; Washington DC. Available from: https://www.researchgate.net/publication/235151297_Viral_Penetration_of_High_Efficiency_Part particulate_Air_HEPA_Filters

СРАВНЕНИЕ РЕЖИМОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК НА ОСНОВЕ СЕЛЕНИДА КАДМИЯ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Ю. А. Кузищин¹✉, И. Л. Мартынов¹, Е. В. Осипов¹, П. С. Самохвалов², А. А. Чистяков¹, И. Р. Набиев²

¹ Кафедра физики микро- и наносистем, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва

² Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва

В настоящее время, флуоресцентная спектроскопия — это мощный инструмент, используемый в биологических и медицинских прикладных исследованиях. Одним из перспективных типов люминесцентных меток для одновременного обнаружения различных биологических агентов в одной пробе являются коллоидные полупроводниковые квантовые точки. Важным направлением совершенствования методики их применения является подбор оптимального режима возбуждения и регистрации флуоресцентного сигнала. Таким образом, целью настоящей работы было получение математического выражения для оценки отношения сигнал/шум в случае импульсного и модуляционного режимов возбуждения. Представлены результаты теоретического сравнения данных режимов возбуждения для регистрации флуоресцентного сигнала от ультра-малых количеств квантовых точек. Показано, что в случае применения квантовых точек CdSe/ZnS в условиях фоновой засветки с мощностью свыше 1 мкВт и временем накопления полезного сигнала свыше 100 мс для достижения высокой обнаружительной способности предпочтительнее использовать модуляционный режим возбуждения.

Ключевые слова: квантовые точки, CdSe/ZnS, люминесценция, возбуждение, фотодетекция

Финансирование: исследование поддержано Министерством здравоохранения Российской Федерации, в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)», государственный контракт К-27-НИР/146-2 от 28.12.15.

✉ **Для корреспонденции:** Юрий Александрович Кузищин
Каширское ш., д. 31, г. Москва, 115409; yuriy.kuzishchin@gmail.com

Статья получена: 29.07.2018 **Статья принята к печати:** 25.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.050

COMPARISON OF FLUORESCENCE EXCITATION MODES FOR CDSE SEMI-CONDUCTOR QUANTUM DOTS USED IN MEDICAL RESEARCH

Kuzishchin YA¹✉, Martynov IL¹, Osipov EV¹, Samokhvalov PS², Chistyakov AA¹, Nabiev IR²

¹ Department of Physics of Micro- and Nanosystems, National Research Nuclear University MEPhI, Moscow

² Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI, Moscow

Fluorescence spectroscopy is a powerful tool used in applied biological and medical research. Colloid semi-conductor quantum dots are promising fluorescent tags for simultaneous detection of different biopathogens. The techniques employing these tags can be improved by selecting the optimal modes for signal excitation and detection. The aim of the present work was to derive a mathematical expression to describe the signal-to-noise ratios in the pulsed and modulated excitation modes. Below, we compare these two modes of fluorescence excitation in ultralow quantities of quantum dots. We demonstrate that modulated excitation should be preferred for CdSe/ZnS quantum dots given that signal accumulation time is over 100 mc and the photosensor is exposed to background light of $> 1 \mu W$.

Keywords: quantum dots, CdSe/ZnS, luminescence, excitation, photodetection

Funding: this work was supported by the Federal Target Program *The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020)* and carried out under the state contract No. K-27-НИР/146-2 dated December 28, 2015.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuri A. Kuzishchin
Kashirskoe shosse, 31, Moscow, 115409; yuriy.kuzishchin@gmail.com

Received: 29.07.2018 **Accepted:** 25.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.050

В настоящее время метод флуоресцентного анализа широко используется в биологических и медицинских прикладных исследованиях. С его помощью изучают структуру белков [1–3], диагностируют раковые [4–8] и аутоиммунные заболевания [9], детектируют и классифицируют биологические патогены и токсины [10]. В большинстве подходов для реализации флуоресцентного метода используют специальные флуоресцентные метки. В

настоящее время среди подобных меток наиболее перспективны полупроводниковые квантовые точки [8, 11–13]. По сравнению с традиционными органическими красителями квантовые точки обладают широким спектром поглощения [14, 15], высоким квантовым выходом [16] и рекордной фотостабильностью [17]. Кроме того, положение спектра испускания флуоресценции квантовых точек контролируется их размером, поэтому существует

возможность «настройки» спектра люминесценции квантовых точек за счет варьирования размера нанокристаллов [16, 18].

В ряде приложений, например при выявлении низких концентраций различных патогенов, поиске признаков аутоиммунных и онкологических заболеваний, необходимо регистрировать сверхнизкие по интенсивности люминесцентные сигналы [10]. Как известно, лучшие современные фотодетекторы, рассчитанные на работу в видимом спектральном диапазоне, способны регистрировать единичные фотоны [10]. Однако подобная техника требует глубокого охлаждения [19, 20] и крайне чувствительна к внешней фоновой засветке [20]. В совокупности с высокой стоимостью перечисленные факторы ограничивают область применения подобных фотодетекторов уникальными лабораторными установками и коммерческими приборами высокого уровня [21–25]. При этом в области прикладных исследований, связанных с проведением большого количества однотипных измерений, существует потребность в относительно высокочувствительном, компактном, недорогом и устойчивом к внешней фоновой засветке фотодетекторе для люминесцентного анализа.

Наиболее перспективным представляется построение подобного фотодетектора с использованием стандартного кремниевых pin-фотодиода. Для подавления влияния воздействия фоновой засветки, могут быть использованы импульсный [26, 27] и модуляционный [28–30] методы возбуждения люминофора. В рамках первого подхода люминесцентный сигнал регистрируется в течение небольшого промежутка времени, сравнимого с временем жизни возбужденного состояния люминофора после возбуждающего импульса. При грамотном подборе интенсивности возбуждающего импульса пиковое значение амплитуды люминесцентного сигнала будет значительно превышать составляющую сигнала, связанную с фоновой засветкой. Недостатком такого метода является использование широкополосных фотодетекторов и регистрирующей аппаратуры, а также дорогостоящих источников возбуждающего лазерного излучения с длительностью импульса, в зависимости от конкретного флуорофора, в диапазоне от 10 нс до десятков пикосекунд.

При использовании второго подхода, влияние фоновой засветки нивелируется за счет превышения частоты модуляции возбуждающего излучения над характерной частотой флуктуации фонового излучения. Обычно частота модуляции излучения лежит в диапазоне 10–100 кГц [31, 32]. В результате при обработке сигнала появляется возможность выделить фурье-компоненту на частоте модуляции возбуждающего излучения и отсеять сигнал, связанный с низкочастотными колебаниями фона.

Практическая реализация фотодетектора для модуляционного режима возбуждения может быть основана на различных подходах, таких как применение узкополосного усилителя, синхронное детектирование, программный фурье-анализ люминесцентного сигнала или их комбинации [31, 32]. Каждый подход имеет свои особенности. Так, программный фурье-анализ люминесцентного сигнала при использовании усилителя с широкой полосой требует большого динамического диапазона и разрядности аналого-цифрового преобразователя (АЦП), но позволяет получить максимальное количество информации о регистрируемом сигнале. Подход с использованием узкополосного усилителя снижает требования к АЦП приемного устройства, но усложняет конструкцию усилителя.

В целом, модуляционный метод возбуждения люминофора требует более простого источника лазерного

излучения, чем импульсный. Метод не лишен недостатков, наиболее очевидным из которых является необходимость длительного накопления сигнала, в то время как метод импульсного возбуждения этого не требует.

Таким образом, на практике оптимальный выбор метода регистрации люминесцентного сигнала низкой интенсивности зависит как от фотофизических свойств используемого люминофора, так и от уровня фоновой засветки. При разработке устройств люминесцентного анализа необходимо также учитывать такие параметры, как быстродействие системы, уровень потребления электроэнергии и стоимость комплектующих.

Целью настоящей работы было проведение комплексного сравнительного анализа методов импульсного и модуляционного возбуждения для регистрации люминесценции низкой интенсивности в видимой области спектра с использованием фотодетекторов на базе кремниевых pin-фотодиодов. В качестве исходного параметра фиксировалась средняя мощность источника возбуждающего излучения. Полученные данные позволят сделать оптимальный выбор системы люминесцентного анализа исходя из времени жизни возбужденного состояния люминофора и уровня фоновой засветки. Обсуждаются вопросы выбора оптимальной частоты модуляции возбуждающего излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для теоретического анализа различных режимов возбуждения флуорофоров в данном разделе будут получены выражения для отношения сигнал/шум на основе стандартной шумовой модели и приведены к удобному для их сравнения виду. В качестве условия сравнения зафиксирована средняя мощность возбуждающего излучения, что позволило сравнить импульсный и модуляционный режимы работы.

Известно, что выходным сигналом подавляющего числа фотодетекторов на основе Si pin-фотодиодов является напряжение [33–36], в то время как сам фотодиод служит источником тока [37]. Для преобразования токового сигнала в напряжение в конструкцию фотодетектора входит трансимпедансный усилитель [38], параметры которого подбирают под конкретную задачу.

Основными характеристиками трансимпедансного усилителя являются сопротивление трансимпеданса R_t и верхняя частота полосы усиления f_p . Для сигнала с частотой ниже f_p справедливо выражение:

$$U_s = P_s \cdot S \cdot R_t,$$

где U_s — напряжение на выходе усилителя, P_s — мощность флуоресцентного сигнала, S — чувствительность фотодиода. Шум усилителя характеризуется плотностью шума выходного напряжения u_{na} . Однако на практике для характеристики шума фотодетектора из соображений удобства предпочитают использовать параметр NEP — эквивалентную шумовую мощность оптического сигнала [37]:

$$NEP = \frac{u_{na}}{R_t \cdot S} \left[\frac{W}{\sqrt{Hz}} \right]. \quad (1)$$

Очевидно, что как NEP, так и порог обнаружения фотодетектора напрямую зависят от шумовых характеристик усилителя и режима работы фотодетектора.

Следует отметить, что шум многокаскадных усилителей определяется шумом их первого каскада [39], в то время как последующие каскады пропорционально увеличивают

амплитуду и сигнала, и шума, не меняя их взаимного отношения. Данное обстоятельство дает нам основание в качестве модели для анализа шумовых характеристик использовать однокаскадный усилитель. Как известно, основным источником шума в трансимпедансных усилителях является тепловой шум нагрузочного сопротивления R_p , который соответствует сопротивлению трансимпеданса R_T . Используя стандартное выражение для теплового шума [40] можно записать:

$$NEP = \frac{1}{S} \cdot \sqrt{\frac{4kT}{R_T}} \sim \frac{1}{\sqrt{R_T}}, \quad (2)$$

в котором k — постоянная Больцмана, T — температура сопротивления.

Из выражения (2) следует, что увеличение нагрузочного сопротивления улучшает шумовые характеристики фотодетектора, однако вследствие наличия у фотодиода фоновой емкости C_p [37] одновременно приводит к снижению верхней рабочей частоты f_p . Приняв во внимание связь между R_T и C_p , выражение для NEP можно переписать в виде:

$$NEP = \frac{1}{S} \cdot \sqrt{8\pi kTC_p f_p} \cdot f_p \quad (3)$$

Из выражения (3) следует, что наиболее простой подход для регистрации ультранизкого флуоресцентного сигнала заключается в использовании непрерывного возбуждения исследуемой пробы и фотодетектора с усилителем постоянного тока. Однако такой подход практически никогда не реализуется из-за наличия дополнительных источников шумового напряжения $\Delta NEP(f)$ в области низких частот, включая фликкер-шум [29, 40, 41], попкорн-шум [40] и флуктуации мощности внешнего освещения [42–45]. На частотах ниже ~1 кГц вклад от данных источников шума может значительно превышать плотность теплового шума и сводить на нет все преимущества низкочастотного фотодетектора [29, 46]. В результате на практике используют методы импульсного и модуляционного возбуждения, которые при грамотном выборе параметров фотодетектора позволяют в значительной степени исключить влияние дополнительных шумов [29]. Вместе с тем каждый из подходов имеет свои особенности.

В случае модуляционного возбуждения при использовании широкополосного усилителя в отсутствии фоновой засветки для отношения сигнал/шум можно записать следующее выражение:

$$S/N = \frac{P_{lum}}{P_n} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot 2}{\left(f_m^2 \left(\frac{8\pi kTC_p f_p}{S^2} + \Delta NEP^2(f) \right) df \right)^{0.5}}, \quad (4)$$

где $\langle P_{lum} \rangle$ — средняя мощность флуоресцентного сигнала, P_n — мощность шума, f_m — частота модуляции возбуждающего излучения. Предполагается, что скважность возбуждающих импульсов равна 2, а верхняя граничная частота усилителя f_p равняется частоте модуляции или незначительно превосходит ее.

Вместе с тем фотодетектор, работающий в режиме модуляционного возбуждения, может иметь лишь узкую полосу усиления Δf_p вблизи частоты модуляции f_p . Для реализации такого подхода можно использовать аппаратное или программное синхронное детектирование [32], узкополосный усилитель [47], узкополосный фильтр [47] или усреднение сигнала по множеству измерений [47]. В результате дополнительный вклад в шум фотодетектора $\Delta NEP(f)$ может быть практически исключен. В случае

$f_m = n \cdot \Delta f_p$, где n можно интерпретировать как число периодов, по которому происходит усреднение сигнала, для фотодетектора с узкополосным усилителем можно получить выражение:

$$S/N = \frac{P_{lum}}{P_n} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S \cdot \sqrt{n}}{f_m \sqrt{2\pi kTC_p}} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S}{\Delta f_p \sqrt{2\pi kTC_p n}}, \quad (5)$$

Отдельной важной задачей при таком подходе является выбор оптимальной частоты модуляции возбуждающего излучения. Из выражения (5) видно, что следует использовать как можно более низкую частоту, которая будет ограничена лишь требованиями по быстродействию системы. Однако в области частот ниже ~1 кГц возрастает вклад дополнительных шумов и работа в таких режимах нецелесообразна. Наличие внешней засветки требует дополнительного анализа с учетом спектральной плотности флуктуации уровня освещения на разных частотах.

В импульсном режиме возбуждения реализуется идея высокой пиковой интенсивности полезного сигнала

$P_{lum} = \langle P_{lum} \rangle \cdot d$, где d — скважность возбуждающих импульсов. Частота следования импульсов f_{ex} определяется из требований по быстродействию всей системы и ограничена сверху временем жизни возбужденного состояния флуорофора τ_{lum} . Если при проведении измерений необходимо одновременно получить информацию о τ_{lum} , то длительность возбуждающего импульса τ_{ex} должна быть значительно меньше, чем τ_{lum} . Однако в общем случае она может быть сравнима с τ_{lum} , что снижает требования к верхней граничной частоте фотодетектора, которая в этом случае равна $f_p \approx 1/\tau_{lum}$ или $f_p = d \cdot f_{ex}$.

Время жизни возбужденного состояния таких флуорофоров, как органические красители и квантовые точки, обычно лежит в диапазоне от 1 до 100 нс [48, 49]. Таким образом, верхняя граничная частота фотодетектора должна быть на уровне ~0,01–1 ГГц. В таких условиях вклад добавочного шума на низких частотах $\Delta NEP(f)$ пренебрежимо мал по сравнению с полным тепловым шумом в широкой частотной полосе усилителя. В результате для NEP и отношения сигнал/шум фотодетектора, работающего в импульсном режиме возбуждения, можно написать выражения:

$$S/N = \frac{P_{lum}}{P_n} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S \cdot d}{\sqrt{8\pi kTC_p f_p} \cdot \sqrt{f_p}} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S}{\sqrt{8\pi kTC_p} \cdot f_{ex}} \quad (6)$$

Для учета влияния на уровень шумов внешней засветки со средней мощностью P_{bg} полученные выражения должны быть изменены. Действительно для модуляционного режима возбуждения влияние фоновой засветки проявляется опосредованно в виде увеличения дробового шума. Для импульсного режима влияние внешней засветки проявляется напрямую как флуктуация уровня освещения с некоторой характерной граничной частотой f_{bg} . С учетом этого, выражения для отношения сигнал/шум для модуляционного и импульсного методов возбуждения флуорофора должны быть представлены следующим образом:

$$S/N = \frac{\langle P_{lum} \rangle}{\left[2\pi kTC_p \Delta f_p^2 n / S^2 + eP_{bg} \Delta f_p / 2S \right]^{0.5}}, \quad (7)$$

$$S/N = \frac{\langle P_{lum} \rangle}{\left[8\pi kTC_p f_{ex}^2 / S^2 + (P_{bg} \tau_{lum} f_{bg})^2 \right]^{0.5}} \quad (8)$$

Выражения (7) и (8) дают возможность провести корректное сравнение величин отношения сигнал/шум

для модуляционного и импульсного методов возбуждения флуорофора при идентичных быстродействии и средней мощности сигнала флуоресценции, а значит и для одинаковой средней мощности возбуждающего излучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основе выражений (7) и (8) было проанализировано отношение сигнал/шум в зависимости от различных параметров: мощности и частоты флуктуации внешней засветки фотодетектора, его быстродействия и времени жизни возбужденного состояния флуорофора. Для удобства анализа были построены следующие графики. На рис. 1А и 1Б представлены кривые зависимости отношения сигнал/шум от мощности внешней фоновой засветки для люминофоров с различным временем жизни возбужденного состояния. На рис. 2А и 2Б представлены графики зависимости отношения сигнал/шум от мощности внешней фоновой засветки для различных характерных частот флуктуации мощности внешней фоновой засветки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отсутствии внешней фоновой засветки фотодетектора метод импульсного возбуждения предпочтителен (рис. 1А и 1Б). При наличии внешней засветки этот метод сохраняет свое преимущество в тех случаях, когда требуется высокое быстродействие системы регистрации флуоресцентного сигнала, а сам флуорофор обладает временем жизни возбужденного состояния не более 1 нс.

В то же время увеличение мощности внешней фоновой засветки уменьшает отношение сигнал/шум в случае импульсного метода быстрее, чем в случае модуляционного. Также необходимо учитывать, что отношение сигнал/шум зависит как от времени жизни возбужденного состояния флуорофора, так и от характерных частот флуктуации мощности фоновой засветки. Таким образом, величина отношения сигнал/шум в случае импульсного возбуждения меньше, чем отношение сигнал/шум в случае модуляции, если время жизни возбужденного состояния люминофора превышает 100 нс. Схожая ситуация наблюдается, если

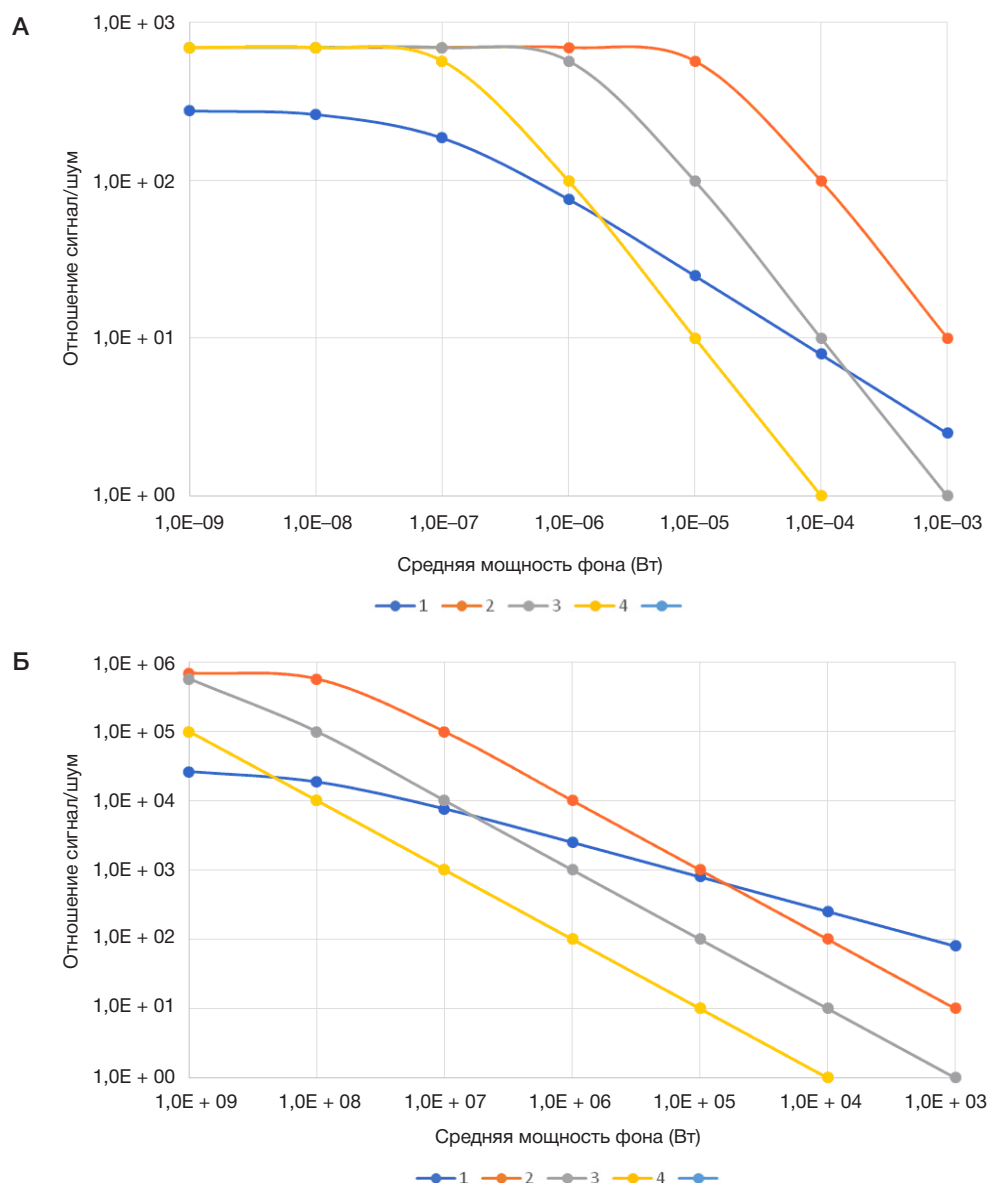


Рис. 1. Отношение сигнал/шум фотоприемника в зависимости от мощности внешней фоновой засветки для режима модуляции (1) и импульсного режима возбуждения люминофора с временем жизни 1 нс (2), 10 нс (3) и 100 нс (4). (А) Время накопления сигнала 1 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, характерная частота флуктуаций фона 100 Гц. (Б) Время накопления сигнала 1000 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, характерная частота флуктуаций фона 100 Гц

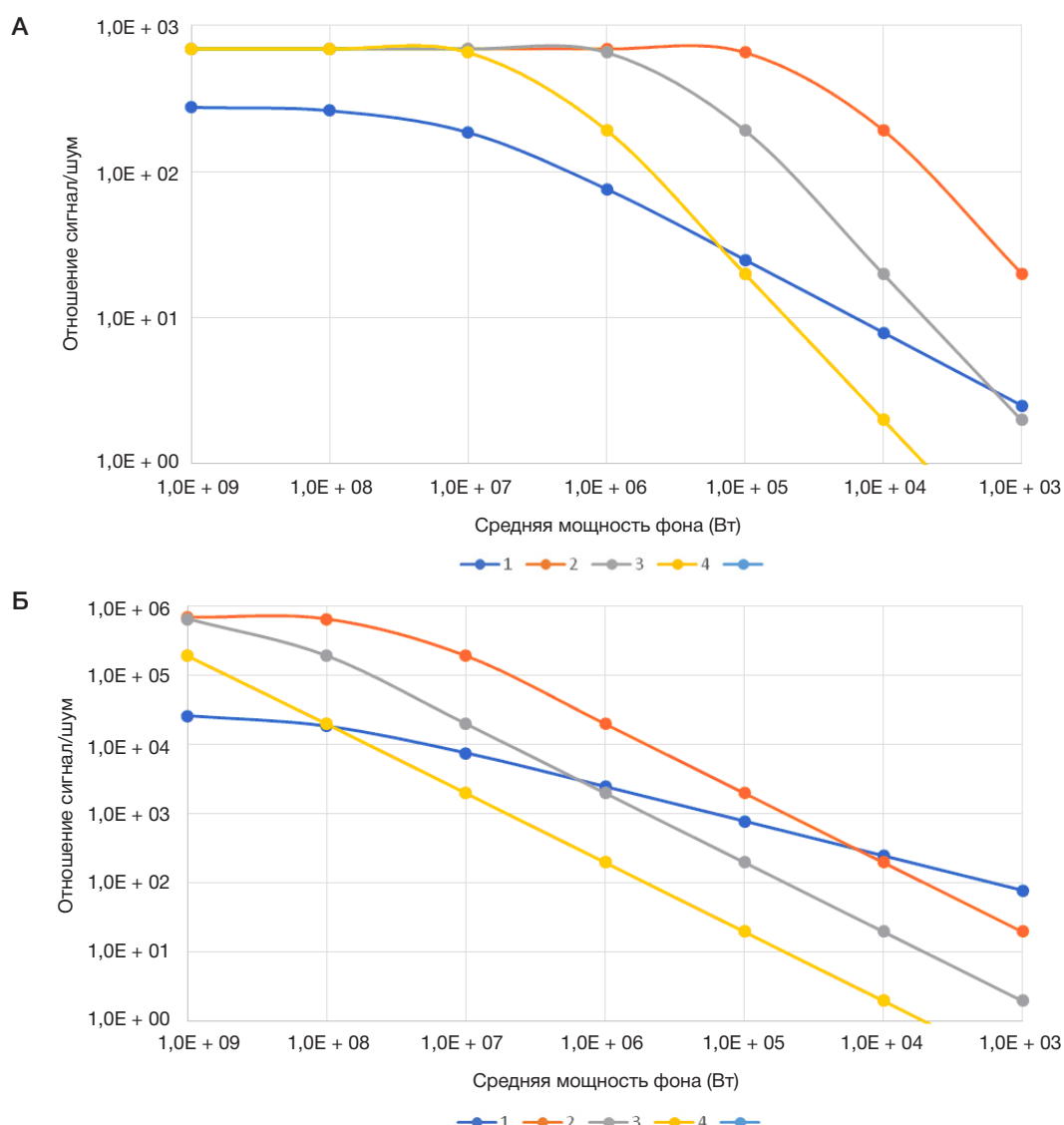


Рис. 2. Отношение сигнал/шум фотоприемника в зависимости от мощности внешней фоновой засветки для режима модуляции (1) и импульсного режима возбуждения в случае, когда характерная частота флуктуации мощности фона равна 10 Гц (2), 100 Гц (3) и 1000 Гц (4). (А) Время накопления сигнала 1 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, время жизни возбужденного состояния люминофора 5 нс. (Б) Время накопления сигнала 1000 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, время жизни возбужденного состояния люминофора 5 нс

средняя мощность фона превышает ~ 1 мкВт, а характерная частота ее флуктуации превышает 100 Гц. Такие условия возникают в случае применения сканирующих систем или при использовании искусственного освещения [42, 43, 50], особенно светодиодных ламп [46]. Предел обнаружения детектирующей системы при использовании модуляционного метода с правильно подобранной частотой модуляции не будет зависеть ни от времени жизни возбужденного состояния люминофора, ни от характерной частоты флуктуации мощности фоновой засветки (рис. 2А и 2Б).

Время жизни возбужденного состояния квантовых точек лежит, как правило, в диапазоне от 10 до 100 нс. Таким образом, использование модуляционного режима возбуждения для задач обнаружения сверхмалого количества полупроводниковых квантовых точек при наличии фонового освещения со средней мощностью свыше 1 мкВт и временем накопления сигнала не менее 100 мс целесообразнее по сравнению с

импульсным режимом. Более того, источники возбуждения для модуляционного режима доступнее по стоимости и проще по сравнению с импульсными источниками с нано- и пикосекундными значениями длительности импульсов.

ВЫВОДЫ

Получено выражение для вычисления величины отношения сигнал/шум для фотоприемников на основе кремниевых ррп-фотодиодов, работающих с системами как импульсного, так и модуляционного возбуждения люминесцентных меток видимого диапазона в условиях наличия фонового освещения. Продемонстрировано, что модуляционный возбуждения целесообразнее импульсного применительно к люминесцентным меткам на основе полупроводниковых точек CdSe/ZnS в присутствии фонового освещения со средней мощностью свыше 1 мкВт и временем накопления сигнала не короче 100 мс.

Литература

- Moullick R, Udgaonkar JB. Identification and structural characterization of the precursor conformation of the prion protein which directly initiates misfolding and oligomerization. *J Mol Biol.* 2017; 429 (6): 886–899.
- Chen H, Rhoades E. Fluorescence characterization of denatured proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18 (4): 516–524.
- Hevekerl H, Tornmalm J, Widengren J. Fluorescence-based characterization of non-fluorescent transient states of tryptophan — prospects for protein conformation and interaction studies. *Sci Rep.* 2016; 6 (1): 35052.
- Dramićanin T, Dramićanin M. Using fluorescence spectroscopy to diagnose breast cancer. *Appl Mol Spectrosc to Curr Res Chem Biol Sci.* 2016.
- Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisserli A, et al. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine: NBM.* 2012; 8 (4): 516–25.
- Bilan R, Ametzazurra A, Brazhnik K, et al. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the Luminex xMAP® system. *Sci Rep.* 2017; (7): 44668.
- Brazhnik K, Sokolova Z, Baryshnikova M, et al. Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples. *Nanomedicine: NBM.* 2015; 11 (5): 1065–75.
- Hafian H, Sukhanova A, Turini M, et al. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots. *Nanomedicine: NBM.* 2014; 10 (8): 1701–9.
- Sukhanova A, Susha AS, Bek A, et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: Antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases. *Nano Lett.* 2007; 7 (8): 2322–7.
- Wessels L, Raad H. Recent advances in point of care diagnostic tools: a review. *Am J Eng Appl Sci.* 2016; 9 (4): 1088–1095.
- Samokhvalov P, Artemyev M, Nabiev I. Basic principles and current trends in colloidal synthesis of highly luminescent semiconductor nanocrystals. *Chem – A Eur J.* 2013; 19 (5): 1534–1546.
- Vokhmintsev KV, Samokhvalov PS, Nabiev I. Charge transfer and separation in photoexcited quantum dot-based systems. *Nano Today.* 2016; 11 (2): 189–211.
- Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods.* 2008; 5 (9): 763–775.
- Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem Mater.* 2003; 15 (14): 2854–60.
- Jasieniak J, Smith L, Van Embden J, Mulvaney P, Califano M. Re-examination of the size-dependent absorption properties of CdSe quantum dots. *J Phys Chem C.* 2009; 113 (45): 19468–74.
- Krivenkov V, Samokhvalov P, Zvaigzne M, et al. Ligand-mediated photobrightening and photodarkening of CdSe/ZnS quantum dot ensembles. *J Phys Chem C.* 2018; DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04544.
- Ramos-Gomes F, Bode J, Sukhanova A et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep.* 2018; (8): 4595.
- Bonilla JC, Bozkurt F, Ansari S, Sozer N, Kokini JL. Applications of quantum dots in food Science and biology. *Trends Food Sci Technol.* 2016; (53): 75–89.
- Collazuol G, Bisogni MG, Marcatili S, Piemonte C, Del Guerra A. Studies of silicon photomultipliers at cryogenic temperatures. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2011; 628 (1): 389–92.
- Takeuchi S, Kim J, Yamamoto Y, Hogue HH. Development of a high-quantum-efficiency single-photon counting system. *Appl Phys Lett.* 1999; 74 (8): 1063–5.
- Moon S, Kim DY. Analog single-photon counter for high-speed scanning microscopy. *Opt Express.* 2008; 16 (18): 13990–14003.
- Benninger RKP, Ashby WJ, Ring E a., Piston DW. A single-photon counting detector for increased sensitivity in two-photon laser scanning microscopy. *Opt Lett.* 2008; 33 (24): 2895–7.
- Du B, Pang C, Wu D, et al. High-speed photon-counting laser ranging for broad range of distances. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 1–6.
- Jang JY, Cho M. Image visualization of photon counting confocal microscopy using statistical estimation. *Optik (Stuttg).* 2016; 127 (2): 844–7.
- Chen W, Wang X, Wang B, et al. Lock-in-photon-counting-based highly-sensitive and large-dynamic imaging system for continuous-wave diffuse optical tomography. *Biomed Opt Express.* 2016; 7 (2): 499.
- Boscher ND, Choquet P, Duday D, Verdier S. Advantages of a pulsed electrical excitation mode on the corrosion performance of organosilicon thin films deposited on aluminium foil by atmospheric pressure dielectric barrier discharge. *Plasma Process Polym.* 2010; 7 (2): 163–71.
- Steen HB, Sørensen OI. Pulse Modulation of the excitation light source boosts the sensitivity of an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry.* 1993; (14): 115–22.
- Huang C, Lu X, Jiang Y, Wang X, Qiao Z, Fan W. Real-time characterization of FM-AM modulation in a high-power laser facility using an RF-photonics system and a denoising algorithm. *Appl Opt.* 2017; 56 (6): 1610–15.
- Gak J, Miguez M, Bremermann M, Arnaud A. On the reduction of thermal and flicker noise in ENG signal recording amplifiers. *Analog Integr Circuits Signal Process.* 2008; 57 (1–2): 39–48.
- De Marcellis A, Palange E, Giuliani R, Janneh M. Very high sensitivity electrically modulated Si-photodiode in photovoltaic-mode as phase-sensitive detector of light power. *Proc IEEE Sensors.* 2014; 2014 December: 1115–7.
- Ayat M, Karami MA, Mirzakuchaki S, Beheshti-Shirazi A. Design of multiple modulated frequency lock-in amplifier for tapping-mode atomic force microscopy systems. *IEEE Trans Instrum Meas.* 2016; 65 (10): 2284–92.
- Bhattacharyya S, Ahmed RN, Purkayastha BB, Bhattacharyya K. Implementation of digital lock-in amplifier. *J Phys Conf Ser.* 2016; 759 (1).
- Datta S, Rajagopalan S, Lemke S, Joshi A. Balanced PIN-TIA photoreceiver with integrated 3 dB fiber coupler for distributed fiber optic sensors. 2014; 9098: 90980Y.
- Angelini P, Blache F, Caillaud C, et al. High sensitivity SOA-PIN/TIA photoreceiver for 40 Gb/s applications and beyond. *Int J Microw Wirel Technol.* 2016; 8 (03): 437–445.
- Rahman SN, Hall D, Mei Z, Lo Y-H. Integrated 1550 nm photoreceiver with built-in amplification and feedback mechanisms. *Opt Lett.* 2013; 38 (20): 4166–9.
- Cervantes FG, Livas J, Silverberg R, Buchanan E, Stebbins R. Characterization of photoreceivers for LISA. *Class Quantum Gravity.* 2011; 28 (9).
- M A, Gregory H. Photodetection. In: Michael Bass, editor. *Handbook of Optics.* McGraw-Hill, Inc.; 1994. 1664 p.
- Lin TY, Green RJ, O'Connor PB. A low noise single-transistor transimpedance preamplifier for Fourier-transform mass spectrometry using a T feedback network. *Rev Sci Instrum.* 2012;83(9).
- Jaquay JW. Designers Guide to: Instrumentation amplifiers. *Exp Tech.* 1977;2(2):40–43.
- Wai Chen. *The Electrical Engineering Handbook.* Elsevier Academic Press; 2004. 1228 p.
- Vernotte F, Lantz E. Metrology and 1/f noise: Linear regressions and confidence intervals in flicker noise context. *Metrologia.* 2015; 52 (2): 222–37.
- Sindhubala K, Vijayalakshmi B. Review in impact of ambient light noise sources and applications in optical wireless communication using LED. *International Journal of Applied Engineering Research.* 2015; 10 (12): 31115–30.
- Pham Q, Rachim V, An J, Chung W-Y. Ambient light rejection using a novel average voltage tracking in visible light communication system. *Appl Sci.* 2017; 7 (7): 670.
- Shen Z, Thomas JJ, Siuzdak G, Blackledge RD. A case study on forensic polymer analysis by DIOS-MS: the suspect who gave us the SLIP. *J Forensic Sci.* 2004; 49 (5): 1028–35.

45. Cletus B, Olds W, Fredericks PM, Jaatinen E, Izake EL. Real-time detection of concealed chemical hazards under ambient light conditions using raman spectroscopy. *J Forensic Sci.* 2013; 58 (4): 1008–14.
46. Kim T, Rylander M, Powers EJ, Grady WM, Arapostathis A. LED lamp flicker caused by interharmonics. *Conf Rec - IEEE Instrum Meas Technol Conf.* 2008: 1920–5.
47. Zumbahlen H, editor. *Linear Circuit Design Handbook.* Newnes/Elsevier; 2008. 960 p
48. Gong K, Martin JE, Shea-Rohwer LE, Lu P, Kelley DF. Radiative lifetimes of zincblende CdSe/CdS quantum dots. *J Phys Chem C.* 2015; 119 (4): 2231–8.
49. Berezin MMY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev.* 2011; 110 (5): 2641–84.
50. Kovalenko B, Roskosky M, Freedman BA, Shuler MS. Effect of ambient light on near infrared spectroscopy. *Trauma Treat.* 2015; 911–6.

References

1. Moulick R, Udgaonkar JB. Identification and structural characterization of the precursor conformation of the prion protein which directly initiates misfolding and oligomerization. *J Mol Biol.* 2017; 429 (6): 886–899.
2. Chen H, Rhoades E. Fluorescence characterization of denatured proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2008; 18 (4): 516–524.
3. Hevekerl H, Tornmalm J, Widengren J. Fluorescence-based characterization of non-fluorescent transient states of tryptophan — prospects for protein conformation and interaction studies. *Sci Rep.* 2016; 6 (1): 35052.
4. Dramićanin T, Dramićanin M. Using fluorescence spectroscopy to diagnose breast cancer. *Appl Mol Spectrosc to Curr Res Chem Biol Sci.* 2016.
5. Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisserli A, et al. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine: NBM.* 2012; 8 (4): 516–25.
6. Bilan R, Ametazurra A, Brazhnik K, et al. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the Luminex xMAP® system. *Sci Rep.* 2017; (7): 44668.
7. Brazhnik K, Sokolova Z, Baryshnikova M, et al. Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples. *Nanomedicine: NBM.* 2015; 11 (5): 1065–75.
8. Hafian H, Sukhanova A, Turini M, et al. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots. *Nanomedicine: NBM.* 2014; 10 (8): 1701–9.
9. Sukhanova A, Susha AS, Bek A, et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: Antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases. *Nano Lett.* 2007; 7 (8): 2322–7.
10. Wessels L, Raad H. Recent advances in point of care diagnostic tools: a review. *Am J Eng Appl Sci.* 2016; 9 (4): 1088–1095.
11. Samokhvalov P, Artemyev M, Nabiev I. Basic principles and current trends in colloidal synthesis of highly luminescent semiconductor nanocrystals. *Chem – A Eur J.* 2013; 19 (5): 1534–1546.
12. Vokhmintcev KV, Samokhvalov PS, Nabiev I. Charge transfer and separation in photoexcited quantum dot-based systems. *Nano Today.* 2016; 11 (2): 189–211.
13. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods.* 2008; 5 (9): 763–775.
14. Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem Mater.* 2003; 15 (14): 2854–60.
15. Jasieniak J, Smith L, Van Embden J, Mulvaney P, Califano M. Re-examination of the size-dependent absorption properties of CdSe quantum dots. *J Phys Chem C.* 2009; 113 (45): 19468–74.
16. Krivenkov V, Samokhvalov P, Zvaigzne M, et al. Ligand-mediated photobrightening and photodarkening of CdSe/ZnS quantum dot ensembles. *J Phys Chem C.* 2018; DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04544.
17. Ramos-Gomes F, Bode J, Sukhanova A et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep.* 2018; (8): 4595.
18. Bonilla JC, Bozkurt F, Ansari S, Sozer N, Kokini JL. Applications of quantum dots in food Science and biology. *Trends Food Sci Technol.* 2016; (53): 75–89.
19. Collazuol G, Bisogni MG, Marcatili S, Piemonte C, Del Guerra A. Studies of silicon photomultipliers at cryogenic temperatures. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2011; 628 (1): 389–92.
20. Takeuchi S, Kim J, Yamamoto Y, Hogue HH. Development of a high-quantum-efficiency single-photon counting system. *Appl Phys Lett.* 1999; 74 (8): 1063–5.
21. Moon S, Kim DY. Analog single-photon counter for high-speed scanning microscopy. *Opt Express.* 2008; 16 (18): 13990–14003.
22. Benninger RKP, Ashby WJ, Ring E a., Piston DW. A single-photon counting detector for increased sensitivity in two-photon laser scanning microscopy. *Opt Lett.* 2008; 33 (24): 2895–7.
23. Du B, Pang C, Wu D, et al. High-speed photon-counting laser ranging for broad range of distances. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 1–6.
24. Jang JY, Cho M. Image visualization of photon counting confocal microscopy using statistical estimation. *Optik (Stuttg).* 2016; 127 (2): 844–7.
25. Chen W, Wang X, Wang B, et al. Lock-in-photon-counting-based highly-sensitive and large-dynamic imaging system for continuous-wave diffuse optical tomography. *Biomed Opt Express.* 2016; 7 (2): 499.
26. Boscher ND, Choquet P, Duda D, Verdier S. Advantages of a pulsed electrical excitation mode on the corrosion performance of organosilicon thin films deposited on aluminium foil by atmospheric pressure dielectric barrier discharge. *Plasma Process Polym.* 2010; 7 (2): 163–71.
27. Steen HB, Sørensen OI. Pulse Modulation of the excitation light source boosts the sensitivity of an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry.* 1993; (14): 115–22.
28. Huang C, Lu X, Jiang Y, Wang X, Qiao Z, Fan W. Real-time characterization of FM-AM modulation in a high-power laser facility using an RF-photonics system and a denoising algorithm. *Appl Opt.* 2017; 56 (6): 1610–15.
29. Gak J, Miguez M, Bremermann M, Arnaud A. On the reduction of thermal and flicker noise in ENG signal recording amplifiers. *Analog Integr Circuits Signal Process.* 2008; 57 (1–2): 39–48.
30. De Marcellis A, Palange E, Giuliani R, Janneh M. Very high sensitivity electrically modulated Si-photodiode in photovoltaic-mode as phase-sensitive detector of light power. *Proc IEEE Sensors.* 2014; 2014 December: 1115–7.
31. Ayat M, Karami MA, Mirzakuchaki S, Beheshti-Shirazi A. Design of multiple modulated frequency lock-in amplifier for tapping-mode atomic force microscopy systems. *IEEE Trans Instrum Meas.* 2016; 65 (10): 2284–92.
32. Bhattacharyya S, Ahmed RN, Purkayastha BB, Bhattacharyya K. Implementation of digital lock-in amplifier. *J Phys Conf Ser.* 2016; 759 (1).
33. Datta S, Rajagopalan S, Lemke S, Joshi A. Balanced PIN-TIA photoreceiver with integrated 3 dB fiber coupler for distributed fiber optic sensors. 2014; 9098: 90980Y.
34. Angelini P, Blache F, Caillaud C, et al. High sensitivity SOA-PIN/TIA photoreceiver for 40 Gb/s applications and beyond. *Int J Microw Wirel Technol.* 2016; 8 (03): 437–445.
35. Rahman SN, Hall D, Mei Z, Lo Y-H. Integrated 1550 nm photoreceiver with built-in amplification and feedback mechanisms. *Opt Lett.* 2013; 38 (20): 4166–9.

36. Cervantes FG, Livas J, Silverberg R, Buchanan E, Stebbins R. Characterization of photoreceivers for LISA. *Class Quantum Gravity*. 2011; 28 (9).
37. M A, Gregory H. Photodetection. In: Michael Bass, editor. *Handbook of Optics*. McGraw-Hill, Inc.; 1994. 1664 p.
38. Lin TY, Green RJ, O'Connor PB. A low noise single-transistor transimpedance preamplifier for Fourier-transform mass spectrometry using a T feedback network. *Rev Sci Instrum*. 2012;83(9).
39. Jaquay JW. Designers Guide to: Instrumentation amplifiers. *Exp Tech*. 1977;2(2):40–43.
40. Wai Chen. *The Electrical Engineering Handbook*. Elsevier Academic Press; 2004. 1228 p.
41. Vernotte F, Lantz E. Metrology and 1/f noise: Linear regressions and confidence intervals in flicker noise context. *Metrologia*. 2015; 52 (2): 222–37.
42. Sindhubala K, Vijayalakshmi B. Review in impact of ambient light noise sources and applications in optical wireless communication using LED. *International Journal of Applied Engineering Research*. 2015; 10 (12): 31115–30.
43. Pham Q, Rachim V, An J, Chung W-Y. Ambient light rejection using a novel average voltage tracking in visible light communication system. *Appl Sci*. 2017; 7 (7): 670.
44. Shen Z, Thomas JJ, Siuzdak G, Blackledge RD. A case study on forensic polymer analysis by DIOS-MS: the suspect who gave us the SLIP. *J Forensic Sci*. 2004; 49 (5): 1028–35.
45. Cletus B, Olds W, Fredericks PM, Jaatinen E, Izake EL. Real-time detection of concealed chemical hazards under ambient light conditions using raman spectroscopy. *J Forensic Sci*. 2013; 58 (4): 1008–14.
46. Kim T, Rylander M, Powers EJ, Grady WM, Arapostathis A. LED lamp flicker caused by interharmonics. *Conf Rec - IEEE Instrum Meas Technol Conf*. 2008: 1920–5.
47. Zumbahlen H, editor. *Linear Circuit Design Handbook*. Newnes/Elsevier; 2008. 960 p.
48. Gong K, Martin JE, Shea-Rohwer LE, Lu P, Kelley DF. Radiative lifetimes of zincblende CdSe/CdS quantum dots. *J Phys Chem C*. 2015; 119 (4): 2231–8.
49. Berezin MMY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev*. 2011; 110 (5): 2641–84.
50. Kovalenko B, Roskosky M, Freedman BA, Shuler MS. Effect of ambient light on near infrared spectroscopy. *Trauma Treat*. 2015; 911–6.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИФЕНОЛОВ ИЗ ДРЕВЕСНОГО СЫРЬЯ

А. Б. Шевелев¹✉, Е. П. Исакова², Е. В. Трубникова³, Н. Ла Порте⁴, Ш. Мартенс⁴, О. А. Медведева⁵, Д. В. Трубников⁶, Р. М. Акбаев⁷, Ю. К. Бирюкова⁸, М. В. Зылькова⁸, А. А. Лебедева¹, М. С. Смирнова¹, Ю. И. Дерябина²

¹ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

² Институт биохимии имени А. Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

³ Курский государственный университет, Курск

⁴ Фонд имени Э. Маха, С. Микеле аль Адидже, Италия

⁵ Курский государственный медицинский университет, Курск

⁶ Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И. И. Иванова, Курск

⁷ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, Москва

⁸ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН, Москва

В связи с выработкой патогенами лекарственной устойчивости к используемым антибиотикам поиск антимикробных агентов нового типа приобретает все большую актуальность. Растительные полифенолы — обширный и перспективный в борьбе с инфекционными заболеваниями класс соединений. Однако они почти не используются в медицинской практике, а результаты их биологических испытаний *in vivo* в литературе отсутствуют. Целью работы было провести сравнительное исследование антимикробной активности препаратов полифенолов ресвератрола (стильбен), дигидрохверцетина и дигидромерицетина (флавонолы), выделенных из коры и древесины хвойных пород, в отношении дерматофитов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. В тесте на подавление роста газона индикаторных культур в условиях радиальной диффузии из лунки установлено, что все три соединения проявляют высокую активность в отношении *S. aureus*: концентрации 0,22 мМ для дигидрохверцетина, 0,15 мМ для ресвератрола и 0,15 мМ для дигидромерицетина превышают предел эффективности. Напротив, в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* даже максимально возможные с учетом растворимости концентрации полифенольных соединений 21,5 мМ, 15,5 мМ и 15,0 мМ не оказывают какого-либо эффекта на рост культур. Полученные данные позволяют рассматривать полифенолы из хвойных растений в качестве перспективного наружного средства для лечения бактериальных инфекций кожи, вызываемых *S. aureus*.

Ключевые слова: полифенолы, флавоноиды, стильбены, антимикробные средства, ресвератрол, антимикробная активность, антиоксиданты, древесное сырье

Финансирование: исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашения о предоставлении субсидии № 14.616.21.0083 от 17.07.2017, уникальный идентификатор RFMEFI61617X0083).

✉ Для корреспонденции: Алексей Борисович Шевелев
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; shevel_a@hotmail.com

Статья получена: 13.06.2018 **Статья принята к печати:** 20.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.043

A STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLYPHENOLS DERIVED FROM WOOD

Shevelev AB¹✉, Isakova EP², Trubnikova EV³, La Porta N⁴, Martens S⁴, Medvedeva OA⁵, Trubnikov DV⁶, Akbaev RM⁷, Biryukova YK⁸, Zylkova MV⁸, Lebedeva AA¹, Smirnova MS¹, Deryabina YI²

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Bakh Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

³ Kursk State University, Kursk

⁴ Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Italy

⁵ Kursk State Medical University, Kursk

⁶ Prof. Ivanov Kursk State Agricultural Academy, Kursk

⁷ Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow

⁸ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Due to the spreading and increasing drug resistance of pathogens, the search for novel antibiotics is becoming ever more important. Plant-derived polyphenols are a vast and promising class of compounds with a potential to fight infectious diseases. Still, they are not routinely used in clinical practice. No reports on the *in vivo* studies of these compounds have been presented. The aim of our work was to compare the antimicrobial activity of resveratrol (stilbene), dihydroquercetin and dihydromyricetin (flavonols) extracted from the bark and wood of conifers against the dermatophytes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Using the radial diffusion assay, we established that dihydroquercetin, resveratrol and dihydromyricetin exhibit high activity against *S. aureus* even at the smallest possible concentrations of 0.22, 0.15, and 0.15 mM, respectively. In contrast, the highest achievable concentrations of these compounds in the solutions (21.5, 15.5 and 15.0 mM for dihydroquercetin, resveratrol and dihydromyricetin, respectively) have no effect on the growth of *P. aeruginosa* and *C. albicans*. These findings suggest that polyphenols derived from conifers could have a potential to be used as a medicine for topical application to treat bacterial infections of the skin caused by *S. aureus*.

Keywords: polyphenols, flavonoid, stilbene, antimicrobial agents, resveratrol, antimicrobial activity, antioxidants, wood

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Subsidy Contract No 14.616.21.0083 since July 17, 2017; ID RFMEFI61617X0083).

✉ Correspondence should be addressed: Alexei B. Shevelev
Gubkina 3, Moscow, 119991; shevel_a@hotmail.com

Received: 13.06.2018 **Accepted:** 20.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.043

Полифенолы относятся к наиболее массовым продуктам вторичного метаболизма растений. Они находят широкое применение в фармацевтике и парафармацевтике, представляя собой основу для производства большинства средств народной медицины. В настоящее время известно свыше 8000 фенольных соединений растительного происхождения, которые классифицируются на простые фенолы, производные гидроксикоричного и гидроксibenзойного спиртов, флавоноиды, стильбены и лигнаны [1]. Флавоноиды — наиболее многочисленный класс полифенольных соединений. Их ключевым элементом является флавоновое ядро: два ароматических кольца, соединенных цепочкой из трех атомов углерода [2]. Флавоноиды (халконы, катехины, антоцианы, лейкоантоцианы, флавоны, флавононы и флавонолы) широко представлены в коре деревьев, цветах, плодах и семенах. Еще одна группа полифенолов — стильбены родственны флавоноидам, так как содержат два бензольных ядра.

Стильбены выполняют функцию противомикробной и антиоксидантной защиты растений от фитопатогенов, озона и ультрафиолетового облучения. Они распространены у самых разных таксономических групп растений, в том числе, у хвойных [3]. Наиболее известным представителем класса стильбенов является ресвератрол. Имеются также публикации об активности птеростильбена, пиносильвина и рапонтицина [2].

В функциональном отношении стильбены и флавоноиды относят к классу фитоалексинов — растительных антибиотиков. Фитоалексины обеспечивают устойчивость растений к инфекционным болезням, синтезируясь в ответ на инфекцию грибов или бактерий. С учетом этого можно ожидать наличие у фитоалексинов бактерицидной активности *in vitro*. Экстракты растений, богатых флавоноидами, — ромашки, подорожника, зверобоя, календулы, как правило, показывают выраженный антибактериальный эффект [4]. В последние годы интерес к фитоалексинам стимулируется возросшей актуальностью исследований, направленных на борьбу с возникновением лекарственной устойчивости и появлением биопленок. Наиболее важными модельными патогенами с этой точки зрения являются *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus mutans* [5]. В качестве перспективных антимикробных средств рассматриваются полифенолы красного вина, ответственные за «французский парадокс»: кверцетин, кэмпферол, ресвератрол и др. [6]. Несмотря на всплеск интереса к проблеме, механизм антибактериальной активности стильбенов и флавоноидов остается неизвестным. При этом все подклассы флавоноидов характеризуются как бактерицидной, так и фунгицидной активностью [7]. Так, ресвератрол подавляет рост возбудителя язвенной болезни желудка *Helicobacter pylori in vitro* [8], усиливает фагоцитоз патогена *C. albicans* [9] и подавляет фагоцитоз бактерий (*S. aureus* и *E. coli*), причем данный эффект опосредуется рецепторами врожденного иммунитета TLR-2.

Несмотря на большой массив данных о наличии антимикробной активности у растительных полифенолов, их использование в клинической практике до настоящего времени проводится только в форме растительных экстрактов, содержание действующего вещества в которых неизвестно или известно приблизительно. Между тем, рядом компаний, в частности TransMIT Gesellschaft fur Technologietransfer mbH (Германия), а также в Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского (Иркутск) налажен

выпуск полифенолов из древесины и коры хвойных деревьев в очищенном виде. Применение этих препаратов в качестве наружного средства для лечения гнойно-воспалительных заболеваний инфекционной природы могло бы оказаться востребованным, особенно, в связи с распространением штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

В рамках работы была поставлена задача охарактеризовать уровень антимикробной активности коммерческих полифенолов из доступного сырья в отношении дерматофитов *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*, сопоставив их между собой и с антимикробными препаратами, используемыми для борьбы с этими возбудителями в качестве наружного средства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ресвератрол и дигидромирицетин, очищенные из древесного сырья, были предоставлены для исследования компанией TransMIT Gesellschaft fur Technologietransfer mbH (Германия). Дигидрокверцетин был получен из Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского (Иркутск). Аутентичность и чистота препаратов контролировались с помощью метода ЯМР-спектроскопии ядер ¹H на приборе Bruker AM-300 (Bruker Daltonics GmbH; Германия). Ресвератрол представлял собой гомогенный 100%-й транс-изомер.

Вещества растворяли в апиогенном физиологическом растворе инъекционного качества (Эском; Москва) и стерилизовали с использованием шприцевых насадок Sterile Minisart®, содержащих полиэтиленсульфоновые мембраны (Sartorius; Germany). Растворы полифенольных соединений хранили в полипропиленовых пробирках с закручивающимися крышками объемом 50 мл при +4 °C вне доступа прямого солнечного света в течение 1 месяца.

Мазь Левомеколь (Нижфарм; Нижний Новгород) — наружное средство для лечения гнойных ран, трофических язв, гнойно-воспалительных поражений кожи и ожогов, содержащую диоксиметилтетрагидропиримидин (4,0%) и хлорамфеникол (0,75%), взвешивали в стерильных пробирках Эппендорф и разводили в 96% этаноле в 10 раз.

Мазь Клотримазол (Glaxo-Wellcome Poznan; Польша), содержащую 1% действующего вещества, разводили в 96% этаноле таким же образом, что и мазь Левомеколь.

Штаммы патогенов человека

Патогенные штаммы *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) и *C. albicans* (NCTC 2625) были получены из коллекции Государственного института стандартизации и контроля им. Л. А. Тарасевича (Москва). Штаммы культивировали на скошенной агаризованной мясо-пептонной среде с добавлением 0,1% глюкозы для бактерий и 1% для *C. albicans* в течение 18–20 ч.

Для получения чашек с индикаторными культурами мясо-пептонный агар объемом 20 мл вносили на стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 9 см. Чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 1 суток и нагревали в суховоздушном термостате до +37 °C.

Приготовленную на мясо-пептонном бульоне 1% агарозу, разливали в стерильные стеклянные пробирки по 2 мл и охлаждали в водяном термостате до 40 °C. В каждую пробирку с расплавленной агарозой вносили по 5×10⁵ КОЕ каждой культуры патогена, размешивали, выливали на чашку с соответствующей питательной средой и равномерно распределяли верхний слой по поверхности.

Через 1 ч после нанесения верхнего слоя индикаторной культуры с помощью стерильного стального пробойника пробивали в агаре лунки диаметром 4 мм.

С использованием в качестве растворителя 96% этанола готовили растворы полифенольных соединений, близкие по концентрации к пределу растворимости: ресвератрол 0,43 М; дигидромирицетин 0,31 М, дигидрокверцетин 0,3 М. Из них, а также из стоковых растворов мазей Левомеколь и Клотримазол в том же растворителе получали разведения в 10, 100 и 1000 раз. Аликвоты каждого из разведений объемом 5 мкл смешивали с 15 мкл стерильной деионизованной воды. 20 мкл полученного раствора вносили в лунки (см. выше). Каждое разведение тестировали в трех повторностях на разных индикаторных чашках. После высыхания внесенных в лунки растворов чашки помещали в термостат при температуре +37 °С и инкубировали в течение 40 ч. Образовавшиеся зоны просветления газона вокруг лунки измеряли штангенциркулем.

Статистическая обработка данных

Определение диаметра зон лизиса проводили с помощью штангенциркуля с точностью до 0,5 мм. Каждое измерение проводили в трех повторностях на разных чашках с индикаторными культурами. Для серии из трех повторностей вычисляли среднеарифметическое значение и среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерений образовавшихся зон просветления газона вокруг лунок с добавленными растворами представлены в таблице.

Антимикробная активность у всех исследованных полифенолов в отношении грамотрицательной бактерии *P. aeruginosa* и *C. albicans* отсутствует даже при максимально возможных концентрациях 21,5, 15,5 и 15,0 мМ соответственно. Напротив, в отношении грамположительной бактерии *S. aureus* все три соединения показывают активность вплоть до минимальной концентрации 0,22, 0,15 и 0,15 мМ соответственно. *In vitro* активность

дигидромирицетина в отношении *S. aureus* немного выше, чем у ресвератрола и дигидрокверцетина.

При этом минимальной действующей концентрацией Левомеколя в отношении *S. aureus* оказалась 24,2 мМ, а в отношении *P. aeruginosa* — 242,3 мМ. Минимальная действующая концентрация Клотримазола в отношении *C. albicans* оказалась ниже 3,4 мМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе имеется ряд исследований антимикробной (антибактериальной и антифунгальной) активности ресвератрола и других полифенолов *in vitro* [10–12]. Например, сообщается о тестировании такой активности в отношении дерматофитов человека [13]. В работе [14] показано, что ресвератрол вызывает подавление фагоцитоза бактерий, воздействуя на макрофаги через рецептор TLR2 и ядерный фактор NF-κB. Имеются также данные о том, что ресвератрол способен подавлять воспаление сетчатки глаза, индуцированное экспериментальным инфицированием *S. aureus* [15]. Однако до настоящего времени полифенолы нигде не применяются в качестве субстанции, представляющей собой альтернативу антибиотикам, что оставляет открытым вопрос о необходимости продолжения испытаний с целью получения исчерпывающей характеристики их специфической фармакологической активности.

Проведенные нами исследования показали, что молярная антимикробная активность полифенолов как флавонольной (дигидромирицетин и дигидрокверцетин), так и стильбеновой природы (ресвератрол) в отношении грамположительного патогена человека *S. aureus* находится на высоком уровне и превышает молярную активность некоторых антибиотиков, традиционно применяемых в качестве наружного средства борьбы с ним.

Напротив, активность полифенолов в отношении грамотрицательного патогена *P. aeruginosa* и дрожжеподобного гриба *C. albicans* оказалась столь низкой, что не детектировалась в использованной тест-системе. Это наблюдение не вполне соответствует опубликованным

Таблица. Оценка антимикробной активности ресвератрола, дигидромирицетина и дигидрокверцетина *in vitro* в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa*, и *C. albicans* методом радиальной диффузии

Вещество	Разведение	Диаметр зоны просветления (мм)		
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Дигидрокверцетин	1/10	9,7 ± 0,4	0	0
	1/100	8,3 ± 0,4	0	0
	1/1000	7,7 ± 0,4	0	0
Ресвератрол	1/10	10,0 ± 0,0	0	0
	1/100	8,3 ± 0,4	0	0
	1/1000	7,3 ± 0,4	0	0
Дигидромирицетин	1/10	11,7 ± 0,4	0	0
	1/100	10,0 ± 0,0	0	0
	1/1000	8,7 ± 0,4	0	0
Левомеколь	1/10	9,3 ± 0,4	6,3 ± 0,4	0
	1/100	6,3 ± 0,4	0	0
	1/1000	0	0	0
Клотримазол	1/10	5,7 ± 0,4	0	12,3 ± 0,4
	1/100	0	0	8,3 ± 0,4
	1/1000	0	0	6,0 ± 0,0

данным [13], где сообщается о наличии у ресвератрола выраженной активности против дерматофитных микроорганизмов *S. aureus* и *P. aeruginosa* (в диапазоне 171–342 мкг/мл, т. е. 39–78 мМ) и микроскопических грибов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* и *Microsporum gypseum* (25–50 мкг/мл, т. е. 5,7–11,4 мМ).

Полученные данные свидетельствуют о высокой перспективности использования растительных полифенолов, прежде всего, дигидромирицетина, в качестве наружного средства для лечения заболеваний кожи, вызванных стафилококковой инфекцией, включая штаммы с лекарственной устойчивостью. Однако для этого требуются предварительные эксперименты по исследованию антимикробной активности полифенолов на животных моделях. Такие работы необходимы для оценки возможной

побочной токсичности этих соединений для клеток животных, а также для оценки их иммуностимулирующих или иммуносупрессорных свойств [14, 15].

ВЫВОДЫ

Выполненное исследование подтверждает наличие у ресвератрола, дигидромирицетина и дигидрокверцетина выраженной антимикробной активности *in vitro* при концентрации 0,15 мМ и выше. Наиболее эффективным оказался дигидромирицетин. Эти результаты показывают значительно большую удельную бактерицидную активность полифенолов по сравнению с традиционным антибактериальным препаратом Левомеколем, минимальная действующая концентрация которого в отношении *S. aureus* составляет 24,2 мМ.

Литература

1. Теплова В. В., Исакова Е. П., Кляйн О. И., Дергачева Д. И., Гесслер Н. Н., Дерябина Ю. И. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2018; 54 (3): 1–21.
2. Гудков С. В., Брусков В. И., Куликов А. В., Бобылев А. Г., Куликов Д. А., Молочков А. В. Биооксиданты. Альманах клинической медицины. 2014; 61 (31): 61–5.
3. Reinisalo M, et al. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2015: 340520.
4. Mishra A, et al. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. Biomed Res Int. 2013: 915436.
5. Quave CL, et al. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. PLoS One. 2012; 7 (1): e28737.
6. Slobodnikova L, et al. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. Molecules. 2016; 21 (12): 1717.
7. Andrae-Marobela K, et al. Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. Curr Drug Metab. 2013; 14 (4): 392–413.
8. Mahady G.B, Pendland SL, Chadwick LR. Resveratrol and red

- wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. Am J Gastroenterol. 2003; 98 (6): 1440–1.
9. Roupe KA, et al. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. Curr Clin Pharmacol. 2006; 1 (1): 81–101.
10. Erleijman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. Free Radic Res. 2004; 38 (12): 1311–20.
11. Волинец А. П. Новообразование защитных фенольных соединений при инфекционном стрессе. В сборнике: Загоскина Н. В., Бурлакова Е. Б., редакторы. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Научный мир, 2010. С. 168–196.
12. Mishra A, Kumar S, Pandey AK., Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. The Scientific World Journal. 2013; 2013; ID 292934.
13. Chan MM. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. Biochem Pharmacol. 2002; 63 (2): 99–104.
14. Iyori M, et al. Resveratrol modulates phagocytosis of bacteria through an NF-kappaB-dependent gene program. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (1): 121–7.
15. Marino A, et al. Resveratrol role in *Staphylococcus aureus*-induced corneal inflammation. Pathog Dis. 2013; 68 (2): 61–4.

References

1. Teplova VV, Isakova EP, Klein OI, Dergacheva DI, Gessler NN, Deryabina Y. I. Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review). Applied Biochemistry and Microbiology, 2018, Vol. 54, No. 3, pp. 221–237
2. Gudkov SV, Bruskov VI, Kulikov AV, Bobyljov AG, Kulikov DA, Molochkov AV. Biooxidanty. Al'manah klinicheskoy mediciny. 2014; 61 (31): 61–5.
3. Reinisalo M, et al. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2015: 340520.
4. Mishra A, et al. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. Biomed Res Int. 2013: 915436.
5. Quave CL, et al. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. PLoS One. 2012; 7 (1): e28737.
6. Slobodnikova L, et al. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. Molecules. 2016; 21 (12): 1717.
7. Andrae-Marobela K, et al. Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. Curr Drug Metab. 2013; 14 (4): 392–413.
8. Mahady G.B, Pendland SL, Chadwick LR. Resveratrol and red

- wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. Am J Gastroenterol. 2003; 98 (6): 1440–1.
9. Roupe KA, et al. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. Curr Clin Pharmacol. 2006; 1 (1): 81–101.
10. Erleijman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. Free Radic Res. 2004; 38 (12): 1311–20.
11. Volynec AP. Novoobrazovanie zashhitnyh fenol'nyh soedinenij pri infekcionnom stresse. V sbornike: Zagoskina NV, Burlakova EB, redaktory. Fenol'nye soedinenija: fundamental'nye i prikladnye aspekty. M.: Nauchnyj mir, 2010. S. 168–196.
12. Mishra A, Kumar S, Pandey AK., Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. The Scientific World Journal. 2013; 2013; ID 292934.
13. Chan MM. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. Biochem Pharmacol. 2002; 63 (2): 99–104.
14. Iyori M, et al. Resveratrol modulates phagocytosis of bacteria through an NF-kappaB-dependent gene program. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (1): 121–7.
15. Marino A, et al. Resveratrol role in *Staphylococcus aureus*-induced corneal inflammation. Pathog Dis. 2013; 68 (2): 61–4.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ ИНФРАКРАСНЫХ ФУРЬЕ-СПЕКТРОВ

А. Ю. Сунцова¹, Р. Р. Гулиев¹, Д. А. Попов², Т. Ю. Вострикова², Д. В. Дубоделов³, А. Н. Щеголихин¹, Б. К. Лайпанов⁵, Т. В. Припутневич³, А. Б. Шевелев^{1,4}✉, И. Н. Курочкин¹

¹ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля, Москва

² Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А. Н. Бакулева, Москва

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

⁴ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва

⁵ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, Москва

Актуальность развития быстрых методов идентификации патогенных биологических объектов растет в связи с массовым распространением в лечебных учреждениях микроорганизмов с лекарственной устойчивостью и в связи с развертыванием центров мониторинга биологических угроз. Инфракрасная Фурье-спектроскопия является эффективной альтернативой масс-спектрометрии с точки зрения стоимости и портативности оборудования, экспрессности анализа. Целью работы было описать алгоритм идентификации микроорганизмов в чистых культурах, основанный на анализе колебательных инфракрасных Фурье-спектров культур (Fourier transform infrared, FTIR). Алгоритм основан на автоматизированном анализе спектров методом главных компонент. В отличие от известных в литературе, он позволяет идентифицировать бактерии вне зависимости от стадии роста культуры и состава среды. Обучающая база данных включала наиболее распространенные возбудители гнойно-септических инфекций человека: *Staphylococcus aureus* ($n = 67$), *Enterococcus faecalis* ($n = 10$), *Enterococcus faecium* ($n = 10$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 10$), *Escherichia coli* ($n = 10$), *Serratia marcescens* ($n = 10$), *Enterobacter cloacae* ($n = 10$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 10$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 10$) и *Candida albicans* ($n = 10$). Построенная модель успешно апробирована на серии клинических изолятов *Staphylococcus aureus*: в слепых испытаниях участвовало 10 штаммов с фенотипом лекарственной устойчивости MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) и 10 чувствительных штаммов, а также смесь культур этих штаммов с клиническими изолятами *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*.

Ключевые слова: спектроскопия, Фурье, ИК-спектр, метод главных компонент, идентификация, бактерии, дрожжи

✉ Для корреспонденции: Шевелев Алексей Борисович
ул. Косыгина, д. 4, г. Москва, 119334; shevel_a@hotmail.com

Статья получена: 01.08.2018 Статья принята к печати: 25.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.046

IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS BY FOURIER-TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY

Suntsova AY¹, Guliev RR¹, Popov DA², Vostrikova TY², Dubodelov DV³, Shchegolikhin AN¹, Laypanov BK⁵, Priputnevich TV³, Shevelev AB^{1,4}✉, Kurochkin IN¹

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow

² Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow

³ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

⁴ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow

⁵ Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow

The need for novel techniques of rapid identification of pathogenic microorganisms arises from the massive spread of drug-resistant nosocomial strains and the emergence of centers for biohazard control. Fourier-transform infrared spectroscopy is a promising alternative to mass spectrometry as it is cost-effective, fast and suitable for field use. The aim of this work was to propose an algorithm for the identification of microorganisms in pure cultures based on the analysis of their Fourier transform infrared spectra. The algorithm is based on the automated principal component analysis of infrared spectra. Unlike its analogues described in the literature, the algorithm is capable of identifying bacteria regardless of the culture medium or growth phase. The training sample included the most prevalent causative agents of infections and sepsis in humans: *Staphylococcus aureus* ($n = 67$), *Enterococcus faecalis* ($n = 10$), *Enterococcus faecium* ($n = 10$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 10$), *Escherichia coli* ($n = 10$), *Serratia marcescens* ($n = 10$), *Enterobacter cloacae* ($n = 10$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 10$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 10$), and *Candida albicans* ($n = 10$). The model we built successfully passed a series of blind tests involving clinical isolates of 10 methicillin-resistant (MRSA) and 10 methicillin-sensitive (MSSA) *Staphylococcus aureus* strains as well as pair mixes of these cultures with clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: spectroscopy, Fourier, IR, principal component analysis, identification, bacteria, yeasts

✉ Correspondence should be addressed: Alexei B. Shevelev
Kosygina 4, Moscow, 119334; shevel_a@hotmail.com

Received: 01.08.2018 Accepted: 25.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.046

Идентификация видовой принадлежности микроорганизмов важна в медицинской микробиологии. В частности, экспресс-идентификация патогена необходима для выбора схемы антибиотикотерапии при лечении гнойных инфекций и сепсиса. Эти заболевания характеризуются стремительным течением и служат одной из частых причин летальных исходов при проведении операций на сердечно-сосудистой системе [1], а также у родильниц и новорожденных детей [2].

В настоящее время во всем мире для окончательной идентификации возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, помимо традиционных микробиологических, широко используются новые методы, в частности, метод матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS). Из наиболее распространенных приборов можно назвать MALDI-ToF масс-спектрометры марок MALDI BioTyper (Bruker; Германия) и Vitek MS (Biomerieux; Франция). Они дают быстрые и достоверные результаты, однако имеют высокую стоимость и пока недоступны для повсеместного использования в лечебных учреждениях. Кроме того, приборы достаточно громоздки и неудобны для работы в полевых условиях, что препятствует их использованию структурами, отвечающими за биологическую безопасность населения.

В качестве возможной альтернативы MALDI ToF масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов может быть рассмотрен метод инфракрасной колебательной Фурье-спектроскопии (Fourier transformation Infrared, FTIR). Он позволяет анализировать химический состав культуры по содержанию любых типов макромолекул и низкомолекулярных соединений. Подготовка образцов культур к анализу тоже проста, как и в случае MALDI ToF масс-спектрометрии: достаточно поместить культуру на подложку из материала, прозрачного в ИК-области спектра и высушить. Спектроскопия FTIR может рассматриваться в качестве метода экспресс-диагностики. Однако ее использование в практической микробиологии ограничено изменчивостью FTIR-спектров культуры в зависимости от состава среды культивирования и фазы ее роста. Целью работы была разработка алгоритма идентификации микроорганизмов в чистых культурах, основанного на анализе FTIR-спектров культур, позволяющем надежно идентифицировать культуру в любой фазе роста на среде любого состава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы патогенов человека

В работе использовали штаммы наиболее распространенных возбудителей гнойно-септических инфекций человека: *S. aureus* (20 изолятов с фенотипом MRSA и 47 изолятов без лекарственной устойчивости), *E. faecalis* ($n = 10$), *E. faecium* ($n = 10$), *K. pneumoniae* ($n = 10$), *E. coli* ($n = 10$), *S. marcescens* ($n = 10$), *E. cloacae* ($n = 10$), *A. baumannii* ($n = 10$), *P. aeruginosa* ($n = 10$), *S. epidermidis* ($n = 10$) и *C. albicans* ($n = 10$).

Возбудители гнойно-септических инфекций человека были выделены от больных, проходивших лечение в стационарах ННПЦССХ им. А. Н. Бакулева и НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Выделение и типирование штаммов осуществляли по стандартной методике [3] с использованием дифференциально-диагностических сред: электролитного солевого агара для стафилококков, агара для выделения энтерококков, агара Эндо-ГПМ для выделения

грамотрицательных палочек, включая энтеробактерии и *P. aeruginosa*, среды Сабуро и мясо-пептонной среды с добавлением 1% глюкозы для *C. albicans*. Подтверждение принадлежности изолятов к указанным видам патогенов проводили с помощью масс-спектрометра MALDI BioTyper (Bruker; Германия).

Изоляты, заранее депонированные при -70°C с использованием системы длительной криоконсервации «Криобанк», первоначально высевали на кровяной агар в аэробных условиях при 37°C в течение суток.

Каждый изолят высевали на агаризованную и жидкую среду двух типов: с содержанием крови и без нее — всего четыре типа сред для каждого изолята. В качестве сред без содержания крови использовали желточно-солевой и мясо-пептонный бульон, бульон Эндо и среду Сабуро. Материал для анализа методом спектроскопии FTIR собирали через 12, 24 и 48 ч.

С целью исключения опасности инфицирования оператора FTIR-спектрометра, а также с целью консервации культур патогенов при закладке на хранение, до снятия спектров их инактивировали добавлением 70% спирта. Для этого из свежих жидких культур отбирали по 30 мкл, помещали в полипропиленовую микропробирку и добавляли 70 мкл 96% этанола, перемешивая пипетированием. Материал с поверхности агаризованных сред отбирали микробиологической петлей и суспендировали в 70% водном этаноле из расчета 30 мг биомассы на 100 мкл спиртового раствора.

Регистрация ИК-спектров культур изолятов

Для регистрации ИК-спектров изолятов использовали фиксированные в 70% водном этаноле суспензии культур патогенов. Процедура подготовки проб индивидуальных патогенов к измерению методом ИК-спектроскопии «на пропускание» состояла в том, что на поверхность стандартных (диаметр 12,5 мм, толщина 2 мм) ZnSe-подложек (Электростекло; Москва) микропипеткой наносили 5–10 мкл конкретной суспензии, которую затем высушивали на воздухе до полного испарения этанола (5–15 мин). Все спектры регистрировали с помощью FTIR-спектрометра Spectrum Two (Perkin-Elmer; США) в интервале волновых чисел $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ при оптическом разрешении 4 см^{-1} (цифровое разрешение 1 см^{-1}). Для записи спектров культур изолятов ZnSe-подложку с нанесенной пробой патогена устанавливали вертикально в специальный держатель образцов «Microfocus» (Perkin-Elmer; США) на пути горизонтального зондирующего ИК-луча прибора и аккумулировали с усреднением 16 индивидуальных сканов (около 2 мин). Для записи фонового спектра прибора в идентичных условиях использовали чистую стандартную ZnSe-подложку, а сам фоновый спектр регулярно обновляли незадолго до регистрации ИК-спектра каждой новой пробы патогена.

Анализ данных

После исключения аномальных спектров полученные исходные данные состояли из 347 спектров чистых культур: 188 спектров *S. aureus* (39 — с MRSA-фенотипом, 48 — с MSSA-фенотипом (methicillin-sensitive *S. aureus*), 101 — не охарактеризованные по наличию фенотипа устойчивости к антибиотикам) и 169 спектров других патогенов (14 — *A. baumannii*, 32 — *C. albicans*, 8 — *E. cloacae*, 21 — *E. faecalis*, 20 — *E. faecium*, 11 — *E. coli*, 17 — *K. pneumoniae*,

18 — *P. aeruginosa*, 8 — *S. marcescens*, 188 — *S. aureus*, 10 — *S. epidermidis*); 10 спектров смешанных культур: 2 — *S. aureus* (MRSA) + *E. coli*, 2 — *S. aureus* (MSSA) + *E. coli*, 2 — *S. aureus* (MRSA) + *K. pneumoniae*, 2 — *S. aureus* (MSSA) + *K. pneumoniae*, 2 — *S. aureus* (MSSA) + *P. aeruginosa*. На рис. 1 представлены исходные спектры, использованные при анализе.

С помощью широко известных в спектроскопии рутинных алгоритмов все исходные спектры подвергали предварительной обработке для приведения всего набора к единому формату и устранения артефактов, вызванных, например, искривлением базовой линии спектров или флуктуациями в атмосфере содержания влаги и углекислого газа. Для этого исходные спектры нормировали на среднее пропускание, после чего рассчитывали первую производную от огибающей спектра, а принимаемые в расчет диапазоны спектральных данных ограничивали интервалами волновых чисел 600–1800 см⁻¹ и 2800–3000 см⁻¹. Поскольку исходные спектры изначально были хорошего качества и не требовали предварительного сглаживания, расчет производной проводили с помощью формулы симметричной разности по двум точкам для численного

дифференцирования. На рис. 2 представлены спектры после предобработки.

На основе предобработанных спектров строили модель, позволяющую идентифицировать присутствие в образце *S. aureus*. Кроме того, на основе спектров *S. aureus* по наличию MRSA/MSSA-фенотипа была построена модель, дискриминирующая MRSA- и MSSA-штаммы. Для построения обеих моделей использовали спектры только чистых культур. Спектры смешанных культур использовали только для валидации полученных моделей.

Обе модели строили с помощью пошагового применения метода главных компонент (principal component analysis, PCA) и линейного дискриминантного анализа (linear discriminant analysis, LDA) [4]. Линейный дискриминантный анализ [5] позволяет вычислить линию (или гиперплоскость), в проекции на которую две (или более) группы разделяются наиболее эффективно. Эффективность разделения групп определяется отношением межгрупповой дисперсии к внутригрупповой. Но из-за особенностей матричных вычислений, принятых в методе, при анализе спектральных данных он не используется напрямую, так как имеется большое количество коррелированных признаков и

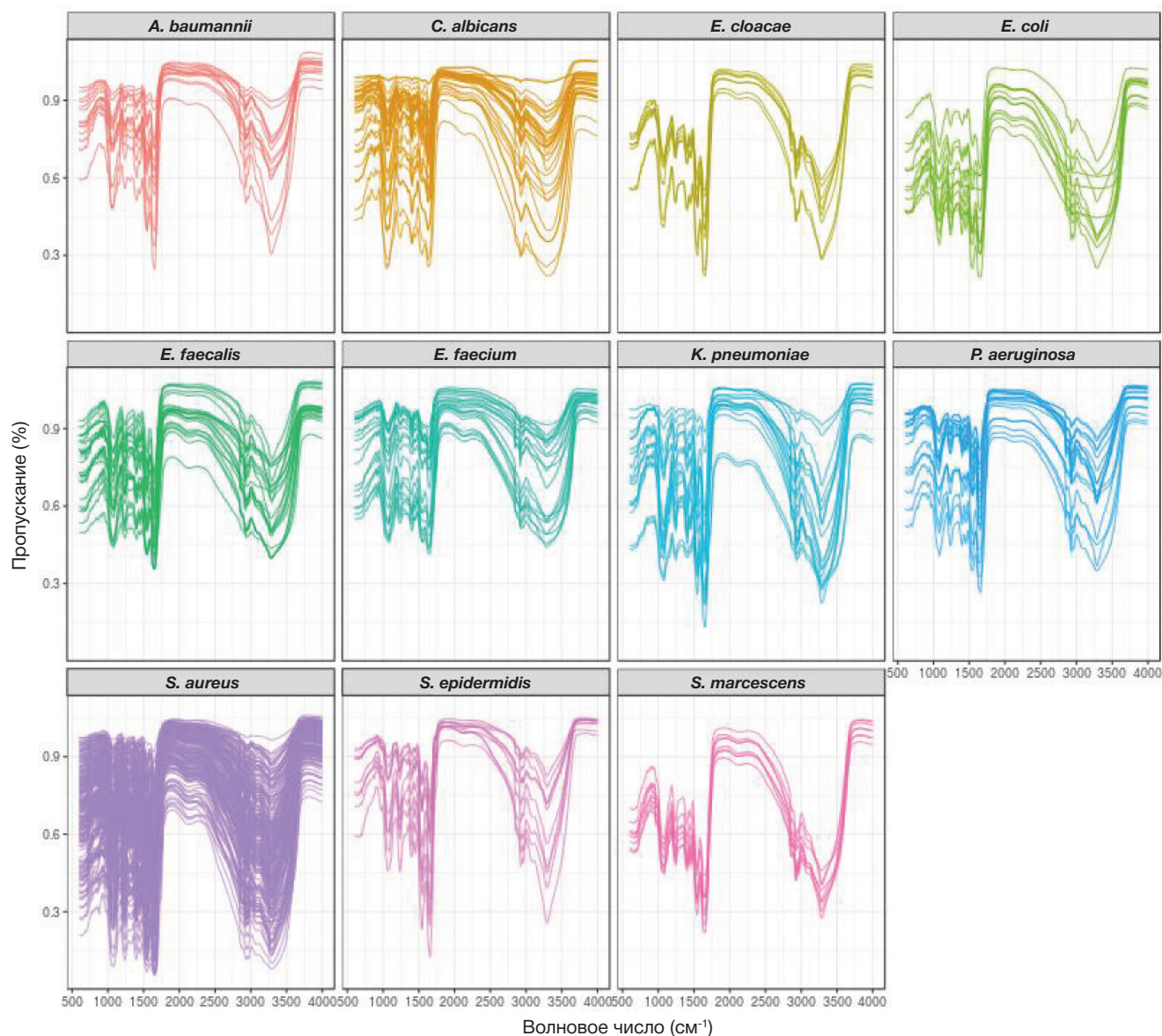


Рис. 1. Исходные инфракрасные Фурье-спектры бактериальных патогенов. Слева направо и сверху вниз в единицах пропускания представлены спектры *A. baumannii*, *C. albicans*, *E. cloacae*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. marcescens*

неинформативных участков. Поэтому перед применением LDA, как правило, используют метод главных компонент, в котором выделяют наиболее информативную и некоррелированную часть информации, имеющуюся в данных. В качестве оценки информативности в методе используется дисперсия: если на каком-то волновом числе дисперсия небольшая, то почти все спектры ведут себя в этой области одинаково и такой участок не несет полезной информации. Выделение информативной и некоррелированной информации в PCA выполняется также путем проецирования данных на соответствующие направления — главные компоненты. Фактически, модель, получаемая с помощью PCA-LDA, является проецированием спектральных данных на новое направление, что на практике означает расчет линейной комбинации с определенными коэффициентами.

Построенные модели валидировали методом скользящего контроля [6]. Суть его заключается в проведении серии слепых контролей: исходные спектры разбивают случайным образом на k частей, одна из частей (тестовая) отбрасывается, а к оставшимся $k - 1$ частям (обучающим) применяется PCA-LDA, и полученная модель

предсказывает значения для тестовой части так, как-будто она не была известна на момент построения модели; данная процедура повторяется для каждой из k частей. Усреднив результаты на тестовых частях, можно получить оценку предсказательной модели на новых неизвестных спектрах. Однако при разбиении на k частей важно контролировать, чтобы спектры, относящиеся к одному и тому же изоляту, попадали только в одну часть. В противном случае оценка искусственно завышается. При построении модели, идентифицирующей *S. aureus*, использовали метод скользящего контроля с $k = 20$, т. е. из общей выборки спектров выделяли 20 частей таким образом, что спектры, относящиеся к одному изоляту, всегда попадали в одну и ту же часть. При построении модели, дискриминирующей MSSA- и MRSA-штаммы, использовали равное количество изолятов каждого типа ($k = 40$). Таким образом, в данном случае каждая часть соответствовала одному изоляту.

Все процедуры предобработки и анализа спектральных данных проводили в программной среде R [7] и интегрированной среде разработки RStudio. Для работы со спектральными данными использовали библиотеку hyperSpec [8], для построения и валидации классифицирующих

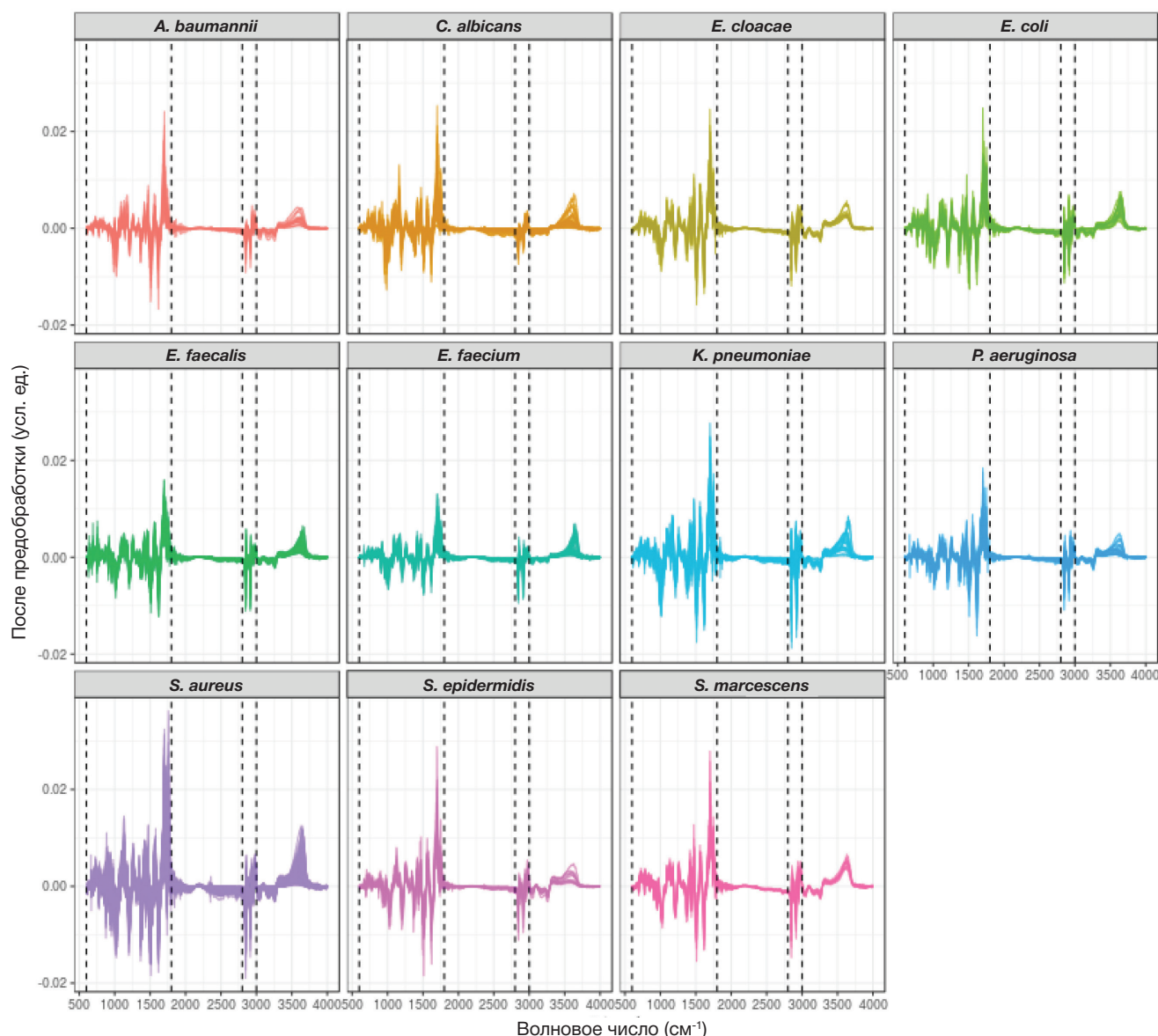


Рис. 2. Исходные Фурье-спектры после предобработки: нормализации на среднее и вычисления первой производной. Пунктирными линиями отмечены границы диапазонов, использовавшихся в анализе: 600, 1800, 2800, 3000 cm^{-1}

моделей — caret [9] и MASS [10]. Иллюстрации были получены с помощью библиотеки ggplot2 [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация золотистого стафилококка

На основе полученных спектров 11 типов наиболее часто встречающихся возбудителей гнойно-септических инфекций человека: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* методом PCA-LDA была построена математическая модель, позволяющая идентифицировать *S. aureus*. Точность модели была оценена методом скользящего контроля по 20 блокам (спектры одного изолята попадали в один блок) и составила в среднем 98,4% ($\pm 4\%$). Однако более детальный анализ результатов применения метода скользящего контроля показал, что почти все ошибки были получены тогда, когда в тестовую часть попадал изолят *S. epidermidis*. Это говорит о том, что на уровне рода модель в существующем виде (с учетом размера и качественного состава штаммов в «обучающей» базе данных) работает хорошо. Для достоверной идентификации штаммов на уровне вида в обучающей выборке оказались недостаточно представлены спектры стафилококков других видов: всего в исходных данных, использованных для анализа, присутствовали спектры только двух изолятов *S. epidermidis*. Наихудшая точность,

полученная в методе скользящего контроля (81%), как раз приходится на случай, когда в тестовую часть попадают спектры изолята *S. epidermidis*, так как в обучающей части недостаточно данных для более достоверного различения *S. epidermidis* и *S. aureus*.

Можно предположить, что эти два родственных вида в принципе не различимы с помощью такого подхода. Но финальная модель, построенная по всем данным (без скользящего контроля, когда все спектры использовались при построении модели), демонстрирует способность различать эти два вида со 100% точностью. Эту способность также наглядно демонстрирует проекция спектральных данных на линейный дискриминант (разделяющую линию в методе PCA-LDA) (рис. 3).

Приведенная проекция на линейный дискриминант по сути результат произведения каждого спектра на вектор коэффициентов: если представить (предобработанный) спектр в виде вектора (набора значений), то линейный дискриминант является результатом линейной комбинации. Настройка модели заключается в подборе оптимальных коэффициентов. Значения данных коэффициентов для полученной модели представлены в виде графика на рис. 4.

Отображение коэффициентов позволяет получить грубую интерпретацию полученной модели: чем больше (по абсолютной величине) значение коэффициента, тем более значим соответствующий диапазон; более высокие (по абсолютной величине) значения (с учетом предобработки

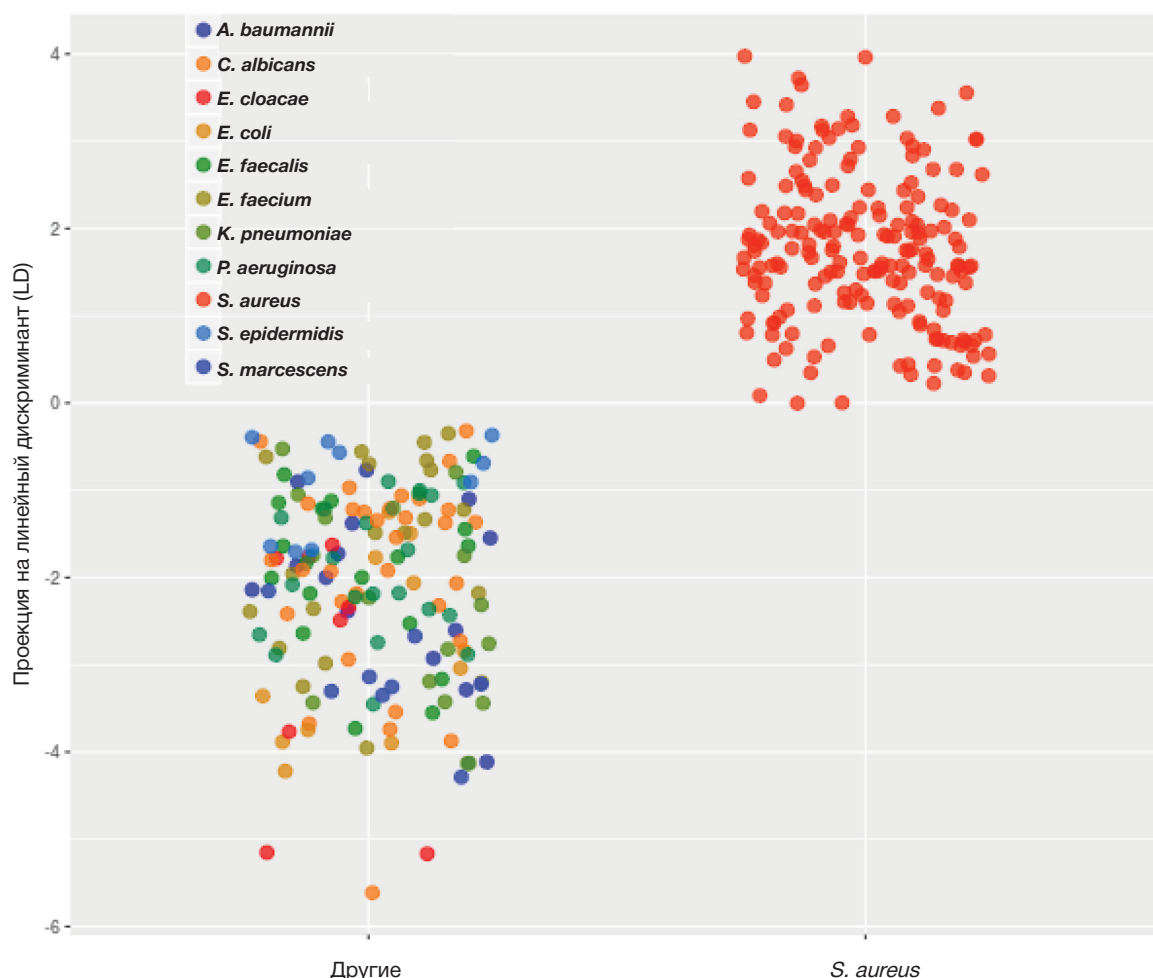


Рис. 3. Проекция исходных данных на линейный дискриминант (LD), полученный с помощью метода PCA-LDA. Цветами отмечены разные патогены. Для удобства восприятия спектры целевого патогена *S. aureus* и других разделены по оси абсцисс. Можно заметить, что группы хорошо разделяются по условию $LD > 0$

и вычисления производной) в областях, где коэффициенты отрицательны, говорят о том, что представленный спектр не относится к *S. aureus*, и наоборот.

Для более развернутой оценки возможности применения подхода в практике медицинской микробиологии была исследована способность полученной модели идентифицировать целевой патоген в смеси с другими бактериями. Для анализа использовали 2 штамма *S. aureus* с фенотипом MRSA и 3 штамма без лекарственной устойчивости. Микроорганизмы выращивали на кровяном бульоне в течение 24 или 48 ч. По окончании культивирования образцы готовили путем смешивания равных объемов культур *S. aureus* с культурами грамотрицательных палочек *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, выращенных на бульоне Эндо. Содержание бактериальных тел в единице объема среды не исследовали. Все образцы-смеси, фиксированные спиртом, были представлены на идентификацию финальной модели, упомянутой выше (табл.).

Во всех спектрах, кроме двух, относящихся к одному образцу, с высокой вероятностью был обнаружен целевой патоген, что говорит о надежности модели и перспективности использования подобного подхода на практике.

Предсказание наличия у изолятов *S. aureus* фенотипа лекарственной устойчивости

Важной задачей медицинской микробиологии является возможность определения антибиотикорезистентности патогена. В данной работе была предпринята попытка выявления фенотипа MRSA/MSSA у изолятов *S. aureus* по спектру FTIR. Построение классифицирующей модели происходило аналогичным образом, т. е. методом PCA-LDA с последующей валидацией методом скользящего контроля.

Такого же хорошего качества модели, как в случае идентификации *S. aureus*, получить не удалось. Точность модели, оцененная методом скользящего контроля, составила 73%. Проекция на линейный дискриминант представлена на рис. 5. Точки разделяются существенно хуже, чем в случае дискриминации *S. aureus* от других патогенов. Однако 80% спектров были идентифицированы точно. Это наблюдение позволяет предполагать, что за счет увеличения объема «обучающей» базы данных удастся повысить достоверность идентификации до практически приемлемого уровня.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые сообщение об использовании FTIR для идентификации микроорганизмов было опубликовано в 1991 г. [12]. Затем вышли работы, посвященные идентификации бактерий во внешней среде, в частности, лактоацилл и возбудителей пищевых токсикоинфекций [13, 14]. В ряде исследований была впервые показана возможность использования FTIR для идентификации таких патогенов, как микобактерии и листерии [15–17]. В 2011 г в связи с появлением коммерчески доступных спектрометров производства Bruker (Германия) и Perkin-Elmer (США), позволяющих достоверно определять колебательные спектры нативных культур микроорганизмов, возросло число публикаций, посвященных использованию FTIR в микробиологии [18–20]. К этому времени относится появление групп, работающих в этой области за пределами Германии: в Польше [21], Великобритании [22, 23] и Нидерландах [24]. Последняя работа интересна тем, что в ней впервые проведена идентификация возбудителей сепсиса у человека, а также приводится сопоставление

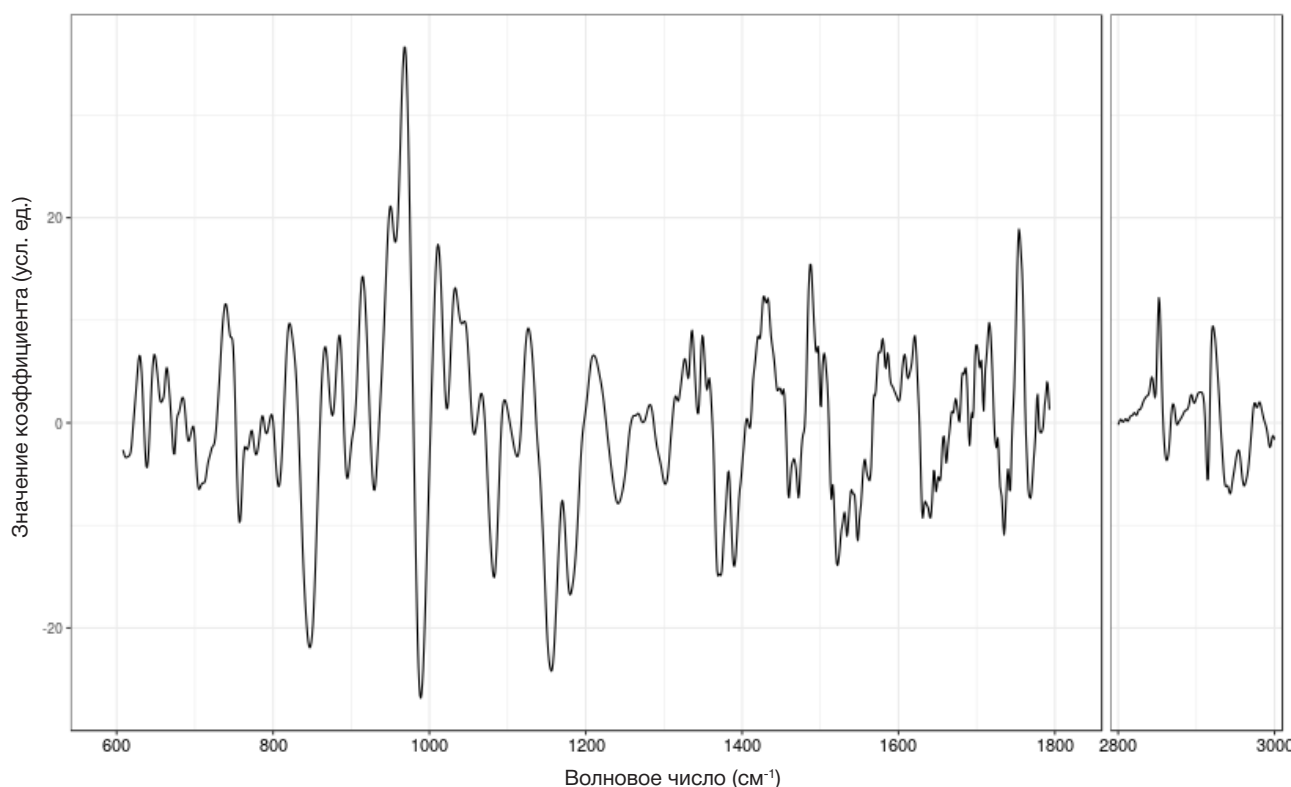


Рис. 4. Коэффициенты линейного дискриминанта, полученного с помощью метода PCA-LDA. Проекция на рис. 3 были получены с помощью этих коэффициентов. Коэффициенты можно интерпретировать как значимость участков со знаком, указывающим на направление влияния. Например, высокие значения исходного спектра в областях, где коэффициенты отрицательны, увеличивают вероятность того, что изолят не представляет собой целевой патоген

разрешающей способности различных методов колебательной спектроскопии: FTIR, спектроскопии Рамановского рассеяния и спектроскопии Рамановского рассеяния с поверхностным усилением (SERS). Авторы делают вывод о том, что FTIR и спектроскопия Рамановского рассеяния дают достоверные и примерно одинаковые результаты, но уступают по чувствительности методу SERS. Метод SERS, напротив, обладает существенно более высокой чувствительностью, но не обеспечивает воспроизводимости результатов идентификации.

В последнее время также появляется много работ, посвященных использованию FTIR в медицинской микробиологии [25–28]. В первой из них на примере ряда патогенных и непатогенных бактерий *P. aeruginosa*, *P. putida*, *E. coli*, *E. faecium*, *Streptomyces lividans*, *B. subtilis*, *B. cereus* и пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* сравнивается разрешающая способность методов колебательной спектроскопии с применением современной приборной базы: SERS (точность 74,9%), спектроскопии Рамановского рассеяния (97,8%) и FTIR (96,2%). В последней работе описывается метод экспресс-идентификации бактерий в форме микроколоний диаметром 50–300 мкм с помощью новейшего Фурье-спектрометра IR-BioType (Bruker): колонии автоматически переносятся с агаризованной среды на подложки из CaF_2 , а для анализа спектров методом главных компонент используется искусственная нейронная сеть (ANN), доступная через сервер Bruker.

Результаты цитированных работ свидетельствуют, что FTIR-спектры достаточно полно характеризуют химический состав клеток (включая биополимеры, являющиеся строительным материалом стенок клетки и мембран, а также внутриклеточные ДНК, фосфолипиды, сахара и др.), чтобы обеспечить возможность: (а) надежной межвидовой дискриминации патогенных бактерий; (б) точной идентификации микроорганизмов до вида; (в) выявления с помощью соответствующих цифровых библиотек спектров принадлежности вновь полученного изолята к таксономической группе внутри вида. Решение этих задач посредством экспресс-анализа, основанного исключительно на данных ИК-спектроскопии, позволило бы оптимизировать процедуру антибиотикотерапии для лечения конкретного больного, избегая назначения препаратов, заведомо неэффективных для борьбы с выявленным у него этиологическим агентом. Однако проблемой на пути внедрения этого подхода в практику клинической микробиологии является отсутствие алгоритма, позволяющего в автоматическом режиме анализировать FTIR-спектры культур микроорганизмов. Такой алгоритм должен выявлять те компоненты спектра, которые зависят только от генетических особенностей штамма и не зависят от условий его культивирования: состава среды, фазы роста и степени деградации культуры и т. д. Особенностью же всех процитированных выше работ является стремление авторов стандартизировать условия культивирования микроорганизмов, что трудно достижимо в условиях клинической диагностики и увеличивает время проведения анализа.

В рамках нашей работы была решена задача по разработке алгоритма, позволяющего идентифицировать видовую принадлежность бактерий вне зависимости от фазы роста и среды культивирования. Для этого наборы клинических изолятов бактерий видов *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* и *C. albicans* культивировали в различных условиях: на нескольких

средах в течение различного времени. Используя метод главных компонент, вычленили наиболее информативную часть FTIR-спектра бактериальных культур. Результат анализа фиксировали в виде системы коэффициентов, которая позволяла за короткое время идентифицировать видовую принадлежность новых изолятов по их FTIR-спектрам. Точность нового метода была оценена в слепом тесте на модели изолятов *S. aureus* и их смесей с *P. aeruginosa*, *E. coli* и *K. pneumoniae*.

Результаты показывают, что предложенный алгоритм анализа FTIR-спектров после обучения на выборке из 11 патогенов различной таксономической принадлежности (бактерии и дрожжи-аскомицеты) достоверно выявляет наличие в культуре *S. aureus* вне зависимости от длительности культивирования (24 или 48 ч). Все образцы

Таблица. Предсказанная вероятность присутствия в образце *S. aureus*

№ образца	Смесь	Предсказанная вероятность присутствия в образце <i>S. aureus</i>
1	MSSA + <i>K. pneumoniae</i>	96,8%
1	MSSA + <i>K. pneumoniae</i>	95,1%
2	MSSA + <i>E. coli</i>	40,0%
2	MSSA + <i>E. coli</i>	41,5%
3	MRSA + <i>K. pneumoniae</i>	96,4%
3	MRSA + <i>K. pneumoniae</i>	97,0%
4	MRSA + <i>P. aeruginosa</i>	90,6%
4	MRSA + <i>P. aeruginosa</i>	87,7%
5	MRSA + <i>E. coli</i>	82,4%
5	MRSA + <i>E. coli</i>	73,0%

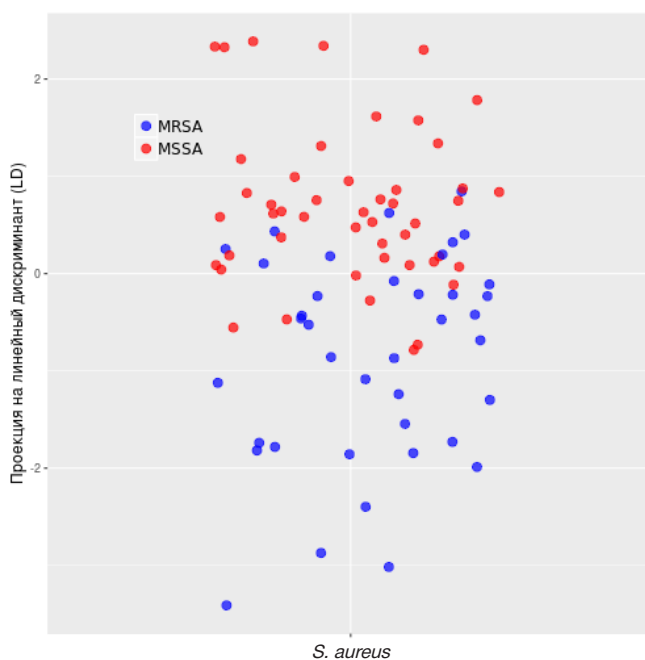


Рис. 5. Проекция на линейный дискриминант, разделяющий штаммы *S. aureus* с фенотипами MSSA и MRSA. Красным отмечены проекции спектров штаммов MSSA, синим MRSA. Группы не разделяются со 100% точностью, однако 80% точек разделяются правильно по условию $LD > 0$

до снятия спектра инактивировались 70% этанолом, что облегчает организацию работы с вирулентными штаммами и хранение образцов для повторного анализа. Присутствие в образце цельной крови и примесей посторонних микроорганизмов (грамотрицательных палочек *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*) в концентрациях, примерно равных концентрации *S. aureus*, не снижает способность алгоритма выявлять целевой патоген. Модель с точностью до 80% может предсказывать наличие у изолятов *S. aureus* фенотипа лекарственной устойчивости (MRSA/MSSA). Результаты тестирования позволяют надеяться, что описанный алгоритм после необходимого расширения «обучающей» базы данных будет способен выявлять любые другие патогены, культивируемые на средах любого удобного для работы состава.

ВЫВОДЫ

Описан способ формирования баз данных и программы сравнения, пригодных для идентификации патогенных микроорганизмов с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии вне зависимости от стадии роста культуры и состава среды. Способ может быть успешно реализован на базе стандартного и доступного по стоимости серийного прибора Spectrum Two (Perkin-Elmer; США). Проведена апробация способа на модели клинических изолятов *S. aureus*, которые достоверно дискриминировались от других распространенных возбудителей гнойных и внутрибольничных инфекций: *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* в виде чистых культур и парных смесей.

Литература

1. Попов Д. А. Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии. *Анналы хирургии*. 2013; (5): 15–21.
2. Припутневич Т. В., Любасовская Л. А., Дубоделов Д. В., Мелкумян А. Р., Игонина Е. П., Акимкин В. Г., Дегтярев Д. Н., Сухих Г. Т. Эффективная профилактика и лечение ИСМП в родовспомогательных учреждениях Российской Федерации: нерешенные вопросы организации и контроля. *Вестник Росздравнадзора*. 2017; (4): 34–41.
3. Попов Д. А., Надточей Е. А. Алгоритм диагностики бактериемии у кардиохирургических больных в орт. *Анестезиология и реаниматология*. 2017; 62 (5): 382–7.
4. Shlens J. A tutorial on Principal Components Analysis. April 7, 2014; Version 3.02.
5. Fisher RA. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics*. 1936; 7 (2): 179–188.
6. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. 4.3 Linear Discriminant Analysis. *The Elements of Statistical Learning* (2 ed.). New York: Springer; 2009. 763 p.
7. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. 7.10 Cross-Validation. *The Elements of Statistical Learning* (2 ed.). New York: Springer; 2009.
8. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2016. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
9. Kuhn M. Contributions from Jed Wing, Steve Weston, Andre Williams, Chris Keefer, Allan Engelhardt, Tony Cooper, Zachary Mayer, Brenton Kenkel, the R Core Team, Michael Benesty, Reynald Lescarbeau, Andrew Ziem, Luca Scrucca, Yuan Tang and Can Candan. *Caret: Classification and Regression Training*. R package version 6.0-71. 2016. <https://CRAN.R-project.org/package=caret>
10. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer; 2002. 495 p.
11. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer; 2009.
12. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*. 1991; 351 (6321): 81–2.
13. Oust A, Mørseth T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. Evaluation of the robustness of FT-IR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Oct 1; 239 (1): 111–6.
14. Wenning M, Theilmann V, Scherer S. Rapid analysis of two food-borne microbial communities at the species level by Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Environ Microbiol*. 2006 May; 8 (5): 848–57.
15. Miguel Gómez MA, Bratos Pérez MA, Martín Gil FJ, Dueñas Díez A, Martín Rodríguez JF, Gutiérrez Rodríguez P, Orduña Domingo A, Rodríguez Torres A. Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods*. 2003 Oct; 55 (1): 121–31.
16. Rebuffo-Scheer CA, Kirschner C, Staemmler M, Naumann D. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. *J Microbiol Methods*. 2007 Feb; 68 (2): 282–90. Epub 2006 Oct 19.
17. Rebuffo-Scheer CA, Dietrich J, Wenning M, Scherer S. Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Mar; 390 (6): 1629–35.
18. Schäwe R, Fetzer I, Tönniges A, Härtig C, Geyer W, Harms H, Chatzinotas A. Evaluation of FT-IR spectroscopy as a tool to quantify bacteria in binary mixed cultures. *J Microbiol Methods*. 2011 Aug; 86 (2): 182–7.
19. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Aug; 97 (16): 7111–20.
20. Wenning M, Breitenwieser F, Konrad R, Huber I, Busch U, Scherer S. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2014 Aug; 103: 44–52.
21. Rygula A, Jekiel K, Szostak-Kot J, Wrobel TP, Baranska M. Application of FT-Raman spectroscopy for in situ detection of microorganisms on the surface of textiles. *J Environ Monit*. 2011 Nov; 13 (11): 2983–7.
22. Driver T, Bajhaiya AK, Allwood JW, Goodacre R, Pittman JK, Dean AP. Metabolic responses of eukaryotic microalgae to environmental stress limit the ability of FT-IR spectroscopy for species identification. *Algal Res*. 2015 Sep; 11: 148–155.
23. Alvarez-Ordóñez A, Mouwen DJ, López M, Prieto M. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2011 Mar; 84 (3): 369–78.
24. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stämmeler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan; 41 (1): 324–9.
25. Muhamadali H, Subaihi A, Mohammadtaheri M, Xu Y, Ellis DI, Ramanathan R, Bansal V, Goodacre R. Rapid, accurate, and comparative differentiation of clinically and industrially relevant microorganisms via multiple vibrational spectroscopic fingerprinting. *Analyst*. 2016 Aug 15; 141 (17): 5127–36.
26. Lasch P, Stämmeler M, Zhang M, Baranska M, Bosch A, Majzner K. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria. *Anal Chem*. 2018 Jul 11.
27. Bishop CM. *Pattern Recognition and Machine Learning*. New York: Springer; 2006. ISBN-10: 0-387-31073-8.
28. Beleites C, Sergo V. *HyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R*, R package version 0.98-20150304. <http://hyperspec.r-forge.r-project.org/>

References

1. Popov DA. Postoperative infectious complications in cardiac surgery. *Annaly hirurgii*. 2013; (5): 15–21.
2. Priputnevich TV, Ljubasovskaja LA, Dubodelov DV, Melkumjan AR, Igonina EP, Akimkin VG, Degtjarev DN, Suhiih GT. Jeffektivnaja profilaktika i lechenie ISMP v rodovspomogatel'nyh uchrezhdenijah Rossijskoj Federacii: nereshennyye voprosy organizacii i kontrolja. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2017; (4): 34–41.
3. Popov DA, Nadtochej EA. Algorithm of bacteremia diagnostic in cardiosurgical patients in ICU. *Anesteziol Reanimatol*. 2017; 62 (5): 382–7.
4. Shlens J. A tutorial on Principal Components Analysis. April 7, 2014; Version 3.02.
5. Fisher RA. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics*. 1936; 7 (2): 179–188.
6. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. 4.3 Linear Discriminant Analysis. *The Elements of Statistical Learning* (2 ed.). New York: Springer; 2009. 763 p.
7. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. 7.10 Cross-Validation. *The Elements of Statistical Learning* (2 ed.). New York: Springer; 2009.
8. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2016. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
9. Kuhn M. Contributions from Jed Wing, Steve Weston, Andre Williams, Chris Keefer, Allan Engelhardt, Tony Cooper, Zachary Mayer, Brenton Kenkel, the R Core Team, Michael Benesty, Reynald Lescarbeau, Andrew Ziem, Luca Scrucca, Yuan Tang and Can Candan. *Caret: Classification and Regression Training*. R package version 6.0-71. 2016. <https://CRAN.R-project.org/package=caret>
10. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer; 2002. 495 p.
11. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer; 2009.
12. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*. 1991; 351 (6321): 81–2.
13. Oust A, Mørreth T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. Evaluation of the robustness of FT-IR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Oct 1; 239 (1): 111–6.
14. Wenning M, Theilmann V, Scherer S. Rapid analysis of two food-borne microbial communities at the species level by Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Environ Microbiol*. 2006 May; 8 (5): 848–57.
15. Miguel Gómez MA, Bratos Pérez MA, Martín Gil FJ, Dueñas Díez A, Martín Rodríguez JF, Gutiérrez Rodríguez P, Orduña Domingo A, Rodríguez Torres A. Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods*. 2003 Oct; 55 (1): 121–31.
16. Rebuffo-Scheer CA, Kirschner C, Staemmler M, Naumann D. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. *J Microbiol Methods*. 2007 Feb; 68 (2): 282–90. Epub 2006 Oct 19.
17. Rebuffo-Scheer CA, Dietrich J, Wenning M, Scherer S. Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Mar; 390 (6): 1629–35.
18. Schawe R, Fetzer I, Tönniges A, Härtig C, Geyer W, Harms H, Chatzinotas A. Evaluation of FT-IR spectroscopy as a tool to quantify bacteria in binary mixed cultures. *J Microbiol Methods*. 2011 Aug; 86 (2): 182–7.
19. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Aug; 97(16): 7111–20.
20. Wenning M, Breitenwieser F, Konrad R, Huber I, Busch U, Scherer S. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2014 Aug; 103: 44–52.
21. Rygula A, Jekiel K, Szostak-Kot J, Wrobel TP, Baranska M. Application of FT-Raman spectroscopy for in situ detection of microorganisms on the surface of textiles. *J Environ Monit*. 2011 Nov; 13 (11): 2983–7.
22. Driver T, Bajhaiya AK, Allwood JW, Goodacre R, Pittman JK, Dean AP. Metabolic responses of eukaryotic microalgae to environmental stress limit the ability of FT-IR spectroscopy for species identification. *Algal Res*. 2015 Sep; 11: 148–155.
23. Alvarez-Ordóñez A, Mouwen DJ, López M, Prieto M. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2011 Mar; 84 (3): 369–78.
24. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stämmler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan; 41 (1): 324–9.
25. Muhamadali H, Subaihi A, Mohammadtaheri M, Xu Y, Ellis DI, Ramanathan R, Bansal V, Goodacre R. Rapid, accurate, and comparative differentiation of clinically and industrially relevant microorganisms via multiple vibrational spectroscopic fingerprinting. *Analyst*. 2016 Aug 15; 141 (17): 5127–36.
26. Lasch P, Stämmler M, Zhang M, Baranska M, Bosch A, Majzner K. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria. *Anal Chem*. 2018 Jul 11.
27. Bishop CM. *Pattern Recognition and Machine Learning*. New York: Springer; 2006. ISBN-10: 0-387-31073-8.
28. Beleites C, Sergio V. HyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R, R package version 0.98-20150304. <http://hyperspec.r-forge.r-project.org/>

ПАРАМЕТРЫ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ВАНКОМИЦИНА У БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЕМ ФУНКЦИИ ПОЧЕК В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ: СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Г. В. Раменская¹, И. Е. Шохин¹, М. В. Лукина²✉, Т. Б. Андрущишина², М. А. Чукина², И. Л. Царев², О. А. Вартамова², Т. Е. Морозова²

¹Кафедра фармацевтической и токсикологической химии имени А. П. Арзамасцева, Институт фармации, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

²Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, лечебный факультет, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

В клинической практике возможной альтернативой фармакокинетическим исследованиям (ФКИ) является методика математического моделирования (ММ) фармакокинетических (ФК) и фармакодинамических (ФД) параметров для расчета доз антибактериальных препаратов. Целью исследования было сравнение параметров ФК ванкомицина, полученных на основе ФКИ и ММ, у пациентов с нарушением функции почек в послеоперационном периоде. В проспективное исследование был включен 61 пациент (47 мужчин и 14 женщин, возраст $60,59 \pm 12,23$ лет). В ходе ФКИ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли C_{trough} , C_{peak} с последующим расчетом площади под фармакокинетической кривой (ПФК₂₄). Расчет параметров ФК при ММ проводили с помощью программы R 3.4.0 на основе однокомпарментной модели. По данным ФКИ значения равновесных C_{trough} через 48 ч от начала антибактериальной терапии были достоверно ниже значений, полученных при ММ ($p = 0,004$). В группе пациентов с острым почечным повреждением (ОПП) на момент завершения терапии значения ПФК₂₄ по данным ФКИ были достоверно выше ($p = 0,011$). Вероятность достижения целевого отношения ПФК₂₄ / МПК > 400 мкг·ч / мл выше в группе пациентов, где C_{trough} составляет 10–15 мкг/мл. Таким образом, результаты исследования подтверждают, что у больных с нарушением функции почек в послеоперационном периоде применение ММ имеет ряд ограничений и необходимо проведение терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ).

Ключевые слова: фармакокинетическое исследование, фармакокинетика ванкомицина, математическое моделирование, острое почечное повреждение, пациенты хирургического профиля

Благодарности: авторы благодарят Бабенко Олега Васильевича, главного врача УКБ № 1 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, за предоставленную возможность проведения фармакокинетического исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Мария Владимировна Лукина
ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, Москва, 119435; mari-luk2010@yandex.ru

Статья получена: 16.05.2018 **Статья принята к печати:** 25.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.051

PARAMETERS OF VANCOMYCIN PHARMACOKINETICS IN POSTOPERATIVE PATIENTS WITH RENAL DYSFUNCTION: COMPARING THE RESULTS OF A PHARMACOKINETIC STUDY AND MATHEMATICAL MODELING

Ramenskaya GV¹, Shokhin IE¹, Lukina MV²✉, Andrushchishina TB², Chukina MA², Tsarev IL², Vartanova OA², Morozova TE²

¹Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Institute of Pharmacy, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

²Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, Faculty of General Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

Mathematical modeling of pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) parameters essential for establishing correct dosing regimens is an alternative to pharmacokinetic studies (PKS) adopted in the clinical setting. The aim of this work was to compare the values of PK parameters for vancomycin obtained in an actual PKS and through MM in postoperative patients with kidney injury. Our prospective study included 61 patients (47 males and 14 females aged 60.59 ± 12.23 years). During PKS, drug concentrations at steady state C_{trough} and C_{peak} were measured by high-performance liquid chromatography followed by the calculation of the area under the plasma concentration-time curve AUC₂₄. For mathematical modeling, a single-compartment model was employed; PK parameters were estimated using R 3.4.0. The values of C_{trough} measured 48 h after the onset of antibiotic therapy during PKS were significantly lower than those predicted by MM ($p = 0.004$). In a group of patients with acute kidney injury (AKI), AUC₂₄ measured at the end of treatment was significantly higher than its value predicted by MM ($p = 0.011$). The probability of achieving the target AUC₂₄ to MIC ratio of over 400 $\mu\text{g}\cdot\text{h} / \text{ml}$ is higher in the group of patients with $C_{trough} = 10\text{--}15 \mu\text{g} / \text{ml}$. Our findings confirm that the use of MM in postoperative patients with renal dysfunction is limited and therapeutic drug monitoring should be used instead.

Keywords: pharmacokinetic study, vancomycin pharmacokinetics, mathematical modeling, acute kidney injury, surgical patients

Acknowledgements: the authors wish to thank Oleg V. Babenko, Chief Physician of the University Clinical Hospital No. 1 of Sechenov First Moscow State Medical University for providing an opportunity to carry out our research

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria V. Lukina
Bolshaya Pirogovskaya, 2, bl. 4, Moscow, 119435; mari-luk2010@yandex.ru

Received: 16.05.2018 **Accepted:** 25.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.051

В настоящее время при назначении антибактериальных препаратов с узким терапевтическим диапазоном для проведения эффективной и безопасной терапии возможно проведение фармакокинетического исследования (ФКИ) или терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ). Согласно международным рекомендациям, в рамках ТЛМ ванкомицина необходимо проводить измерение равновесных остаточных концентраций (C_{trough}), расчет площади под фармакокинетической кривой за 24 ч ($ПФК_{24}$) и определять отношения $ПФК_{24}$ к минимальной подавляющей концентрации (МПК). Существует ряд ограничений, не позволяющих активно использовать ТЛМ в рутинной практике, зачастую связанных с невозможностью получения большого количества образцов крови для расчета $ПФК_{24}$ [1, 2].

Применение математического моделирования (ММ) параметров ФК антибактериальных препаратов может быть альтернативой ТЛМ в отдельных клинических ситуациях. Для выбора стартового режима дозирования некоторых антибактериальных препаратов (ванкомицина, аминогликозидов, колистина) были предложены различные варианты ММ, или «медицинские калькуляторы» [3, 4]. Для ванкомицина «медицинский калькулятор» основан на однокомпарментной фармакокинетической модели и позволяет проводить моделирование отношения параметров ФК/ФД для расчета доз препарата с учетом индивидуальных особенностей пациента (пол, возраст, вес, почечная функция), значения МПК [5, 6]. Внедрение в клиническую практику различных вариантов ММ, дает возможность снизить потребность в проведении ТЛМ.

Сведения о возможности ММ параметров ФК в отдельных группах пациентов немногочисленны. Кроме того, существует ряд недостатков, связанных с невозможностью оценки динамики процессов биотрансформации, объема распределения и скорости элиминации антибактериальных препаратов у пациентов с острыми нарушениями функции почек в раннем послеоперационном периоде. Имеют значение также высокая стоимость оборудования и программного обеспечения, необходимого для проведения ММ [7, 8].

Анализ литературы не позволяет сделать однозначного вывода о возможности замены ТЛМ методами ММ, поскольку ограничены данные о сопоставимости результатов этих методик в различных клинических ситуациях.

Таким образом, для совершенствования методики ММ параметров ФК необходимо проведение ФКИ в различных группах пациентов. Данные исследования позволят оптимизировать эффективность и безопасность терапии ванкомицином в отдельных группах пациентов.

Целью работы было сравнение параметров ФК ванкомицина, полученных при ФКИ и с помощью ММ у пациентов хирургического профиля с острым нарушением функции почек.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проспективное обсервационное исследование было проведено на базе Университетской клинической больницы №1 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова в период с сентября 2016 г. по январь 2018 г. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом (№ 05–16 от 18.05.2016).

В исследование включен 61 пациент (из них 47 мужчин и 14 женщин) с гнойно-септическими осложнениями после оперативного вмешательства. Средний возраст составил $60,59 \pm 12,23$ года. В послеоперационном периоде пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от наличия острого почечного повреждения (ОПП) [9]: 1-я группа — пациенты с ОПП ($n = 35$; 66,6%), 2-я группа — без ОПП (контрольная группа) ($n = 26$; 33,4%). В группе с ОПП преобладали пациенты с легким и умеренным нарушением функции почек: 1-я стадия ОПП была диагностирована у 19 (31,1%) пациентов, 2-я стадия у 13 пациентов (21,3%), 3-я стадия у 3 пациентов (4,9%). Подробная характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1. Группы были сравнимы по основным клиническим характеристикам, однако в группе с ОПП пациенты были достоверно старше ($p = 0,004$). В послеоперационном

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Клиническая характеристика	Итого $n = 61$	Без ОПП $n = 26$ (44,8%)	С ОПП $n = 35$ (55,7%)	p
	$M \pm SD$	$M \pm SD$	$M \pm SD$	
Возраст, лет	$60,59 \pm 12,23$	$55,46 \pm 12,89$	$64,4 \pm 10,33$	0,004*
ИМТ, кг/м ²	$27,4 \pm 5,2$	$27,12 \pm 6,1$	$27,29 \pm 4,5$	0,726
ФВ ₀ , %	$59,02 \pm 7,86$	$62,53 \pm 6,74$	$56,89 \pm 7,83$	0,018*
КК ₀ , мл/мин	$96,48 \pm 29,01$	$96,26 \pm 24,76$	$96,64 \pm 32,16$	0,96
КК ₁ , мл/мин	$61,5 \pm 27,2$	$81,51 \pm 23,54$	$46,64 \pm 19,1$	< 0,0001*
КК ₂ , мл/мин	$85,98 \pm 32,33$	$87,37 \pm 33,52$	$84,95 \pm 31,86$	0,776
Альбумин ₀ , мг/дл	$41,21 \pm 4,2$	$42,46 \pm 4,35$	$40,29 \pm 3,97$	0,447
Альбумин ₁ , мг/дл	$33,56 \pm 1,52$	$32,21 \pm 2,84$	$44,57 \pm 1,61$	0,047*
Длительность госпитализации, сут.	$25,07 \pm 15,069$	$26,77 \pm 4,27$	$23,8 \pm 1,17$	0,451
Длительность ИВЛ, сут.	$3,30 \pm 1,75$	$3,00 \pm 1,29$	$3,51 \pm 0,887$	0,736
Длительность ОРИТ, сут.	$6,46 \pm 1,187$	$6,5 \pm 2,27$	$6,43 \pm 1,23$	0,977
Кровопотеря, мл	$653,44 \pm 604,65$	$512,1 \pm 258,8$	$758,00 \pm 754,66$	0,118
Летальность, %	11 (18%)	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0,454

Примечание: * — достоверные различия, $p_{value} < 0,05$; ИМТ — индекс массы тела; КК — клиренс креатинина по Кокрофту–Голту; КК₀ — до операции; КК₁ — на 2–3 сутки после операции; КК₂ — на 7–10 сутки после операции; ИВЛ — искусственная вентиляция легких; ФВ — фракция выброса.

периоде в группе с ОПП уровень альбумина у больных был выше, чем в группе сравнения ($p = 0,047$).

Режим назначения ванкомицина

Все пациенты с инфекционными осложнениями получали ванкомицин (Эдицин) (Сандоз; Словения). Режим дозирования ванкомицина определяли в соответствии с инструкцией по медицинскому применению из расчета 15–20 мг/кг массы тела (максимальная суточная доза не превышала 2 г) с учетом функции почек на основе расчетных значений клиренса креатинина (КК, мл/мин) по формуле Кокрофта Голта. Ванкомицин вводили внутривенно капельно в течение 60 мин каждые 12 ч [10]. Последующая коррекция режима дозирования проводилась через 24–48 ч с учетом расчетного значения КК.

Пациенты с ОПП получали достоверно более низкие суточные дозы ванкомицина, чем пациенты без нарушений функции почек ($928,6 \pm 275$ мг и $1637,9 \pm 515,8$ мг соответственно; $p < 0,0001$). Длительность антибактериальной терапии зависела от тяжести инфекционных осложнений, локуса, результатов микробиологического исследования и индивидуальной переносимости терапии и составила $9,61 \pm 3,8$ сут. Достоверно длительность терапии в группах не различалась ($9,17 \pm 3,6$ и $10,19 \pm 4$ сут. соответственно; $p = 0,353$).

Параметры фармакокинетики ванкомицина по данным фармакокинетического исследования на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии

Всем пациентам, включенным в исследование, проводили забор образцов крови для ФКИ в соответствии с рекомендациями по ТЛМ ванкомицина [1]. Для определения равновесных концентраций C_{peak} (через 60 мин после окончания внутривенной инфузии) и C_{trough} (за 60 мин перед введением очередной дозы препарата) взятие образцов крови проводили через 48 ч от начала (1) и на момент завершения антибактериальной терапии (2) [11].

Подготовку образцов проводили путем осаждения белков метанолом. Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260, оснащенный градиентным насосом, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-селективным детектором Agilent 6460 (Agilent Technologies; США). Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax Eclipse Plus-C18 $2,1 \times 50$ мм, 1,8 мкм с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 $12,5 \times 2,1$ мм, 1,8 мкм.

На основании полученных равновесных значений C_{peak} и C_{trough} проводили расчет ПФК₂₄ с помощью уравнений динамики как сумму различных фаз («метод трапеций») [12]:

$$\text{ПФК}_{24} = \frac{(\text{Lintrap} + \text{Logtrap}) \times 24}{\tau};$$

где Lintrap — площадь под фармакокинетической кривой линейной фазы инфузии:

$$\text{Lintrap} = \frac{(C_{\text{trough}} + C_{\text{peak}}) \times T_{\text{inf}}}{2};$$

где T_{inf} — продолжительность инфузии (ч).

Logtrap — площадь под «логарифмической» фазой элиминации:

$$\text{Logtrap} = \frac{(C_{\text{peak}} - C_{\text{trough}}) \tau - T_{\text{inf}}}{\ln \frac{C_{\text{peak}}}{C_{\text{trough}}}};$$

где τ — время между инфузиями (ч).

Методика проведения математического моделирования

Математическое моделирование проводили с использованием компьютерной программы R 4.3.0 [12]. Определяли расчетные значения C_{peak} , C_{trough} и ПФК₂₄ с использованием уравнений «динамики» для однокомпарментной модели через 48 ч от начала (1) и на момент завершения антибактериальной терапии (2) [13] по формулам:

$$C_{\text{peak}} = \frac{\text{Dose} \times 1 - e^{-T_{\text{inf}} \times K_{\text{el}}}}{T_{\text{inf}} \times V_d \times K_{\text{el}} \times (1 - e^{-\tau \times K_{\text{el}}})};$$

$$C_{\text{trough}} = C_{\text{peak}} \times e^{-K_{\text{el}} \times (\tau - T_{\text{inf}})};$$

где Dose — разовая доза ванкомицина (мг),

T_{inf} — продолжительность инфузии (ч),

τ — время между инфузиями (ч),

K_{el} — предсказанная константа элиминации (ч⁻¹),

V_d — кажущийся объем распределения (л/кг):

$$V_d = 0,7 \times M;$$

где M — абсолютная масса тела пациента (кг).

Для расчета предсказанной константы элиминации применяли следующее уравнение [14]:

$$K_{\text{el}} = 0,00083 \times \text{КК} + 0,0044;$$

где КК — клиренс креатинина (мл/мин) по Кокрофту–Голту:

$$\text{КК} = \frac{[140 - \text{возраст}] \times \text{вес тела (кг)} \times (10,05 \text{ для жен или } 10,23 \text{ для муж})}{\text{креатинин плазмы крови (мкмоль/л)}}.$$

Для расчета ПФК₂₄ применяли «метод трапеции»:

$$\text{ПФК}_{24} = \frac{(\text{Lintrap} + \text{Logtrap}) \times 24}{\tau}.$$

Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ IBMSPSS Statistics 18.0. и R 3.4.0. Данные представлены в виде средних величин (M) и среднего квадратичного отклонения (SD) для нормально распределенных непрерывных величин; медианы (Me) и интерквартильного размаха (IQR) для остальных случаев и частот для категориальных переменных. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Достоверность различий частот определяли при помощи точного критерия Фишера. Достоверность различий среднего арифметического в группах определяли при помощи дисперсионного анализа (ANOVA). Помимо дисперсионного анализа, использовали непараметрические методы, определяли достоверность различия средних рангов между двумя группами с помощью U-критерия Манна–Уитни–Уилкоксона. Различия считали статистически достоверными (статистически значимыми) при $p < 0,05$. Для установления корреляционных связей между клинически значимыми параметрами фармакокинетики, C_{trough} и ПФК₂₄, использовали корреляционный анализ по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При сравнении параметров ФК ванкомицина по данным ФКИ и ММ через 48 ч от начала (1) и на момент завершения антибактериальной терапии (2) было установлено, что фактические значения K_{el} были достоверно выше расчетных значений по данным ММ ($0,109$ ($0,08$ – $0,15$) и $0,06$ ($0,04$ – $0,072$) соответственно; $p < 0,0001$). Фактические значения равновесных C_{trough} были достоверно ниже

значений, полученных при ММ (11,32 (8,1–16,4) и 16,59 (14,03–24,8) соответственно; $p = 0,004$). При этом значения C_{trough}^2 по данным ФКИ и ММ достоверно не различались. Через 48 ч от начала антибактериальной терапии значения ПФК_{24} достоверно не различались ($p = 0,715$). На момент завершения антибактериальной терапии фактические значения ПФК_{24}^2 были достоверно выше расчетного уровня (564,04 (409,5–751,9) и 347,03 (267,43–479,99) соответственно; $p = 0,011$) (табл. 2).

При сравнении параметров ФК по данным ФКИ и ММ в группах с ОПП и без ОПП достоверных различий не получено, за исключением фактических значений уровня K_{el}^1 ($p = 0,037$), которая была достоверно выше у пациентов с нарушениями функции почек (табл. 2).

Параметры ФК ванкомицина, полученные в ходе ФКИ, демонстрируют высокую вариабельность значений C_{trough} и ПФК_{24} как на момент начала, так и по завершении антибактериальной терапии (рис. 1). Это можно объяснить индивидуальными особенностями ФК ванкомицина в представленной выборке на фоне стандартного режима дозирования. Однако полученный разброс ФК параметров ванкомицина по данным ММ и достоверное отличие от фактических результатов ФКИ ограничивают возможность применения данного варианта ММ в группе пациентов с острыми нарушениями функции почек.

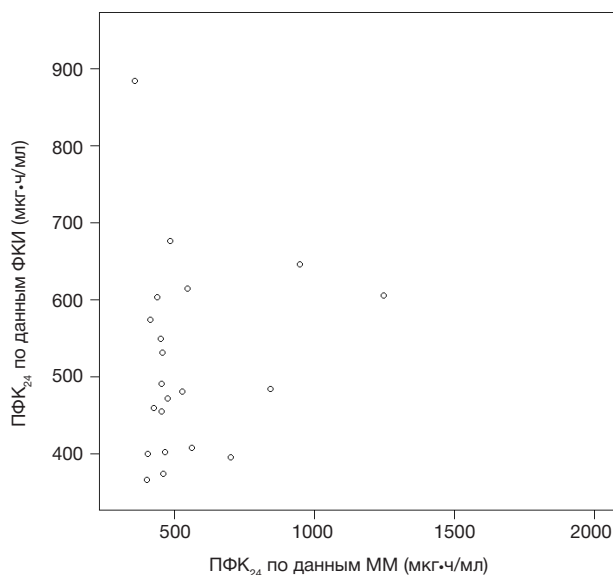
В группе пациентов, у которых уровень равновесных C_{trough} достигал 10–15 мкг/мл, значения ПФК_{24} были выше 400 мкг × ч /мл как через 48 ч от начала терапии (рис. 2),

Таблица 2. Сравнение параметров фармакокинетики ванкомицина, полученных в результате проведения ФКИ и ММ, в том числе в группах больных с ОПП и без ОПП, через 48 ч от начала терапии и на момент завершения терапии

ФК показатель	ТЛМ	ММ	Тест Манна- Уитни- Уилкоксона; <i>p</i>	ТЛМ (<i>n</i> = 61)		Тест Манна- Уитни- Уилкоксона; <i>p</i>	ММ (<i>n</i> = 61)		Тест Манна- Уитни- Уилкоксона; <i>p</i>
	(<i>n</i> = 61)	(<i>n</i> = 61)		ОПП+ (<i>n</i> = 35)	ОПП–		ОПП+	ОПП–	
	Me [IQR]			Me [IQR]			Me [IQR]		
Kel ¹ (ч ⁻¹)	0,109 [0,08–0,15]	0,06 [0,04–0,072]	< 0,0001	0,12 [0,1–0,14]	0,1 [0,06–0,131]	0,037	0,04 [0,04–0,07]	0,06 [0,06–0,077]	0,117
Kel ² (ч ⁻¹)	0,08 [0,05–0,14]	0,08 [0,063–0,102]	0,274	0,06 [0,05–0,15]	0,11 [0,07–0,13]	0,412	0,08 [0,05–0,15]	0,09 [0,07–0,11]	0,709
C ¹ _{trough} (мкг/мл)	11,32 [8,1–16,4]	16,59 [14,03–24,8]	0,004	9,6 [6,9–15,0]	12,08 [8,8–18,27]	0,197	16,2 [14,2–19,7]	14,03 [13,24–18,04]	0,54
C ² _{trough} (мкг/мл)	12,59 [8,5–22,8]	8,65 [5,9–12,06]	0,092	15,7 [6,6–25,8]	12,59 [9,1–21,7]	0,776	8,3 [6,08–11,6]	10,14 [5,7–12,5]	0,765
C ¹ _{peak} (мкг/мл)	35,6 [31,2–37,2]	27,3 [24,2–32,2]	0,019	35,1 [30,9–37,8]	23,8 [21,3–31,4]	0,502	26,2 [15,8–27,2]	28,2 [26,6–32,8]	0,502
C ² _{peak} (мкг/мл)	22,5 [18,6–30,7]	34,8 [31,7–41,9]	0,002	35,6 [31,9–40,7]	23,8 [21,3–31,4]	0,263	26,23 [24,11–28,1]	34,8 [30,1–43,1]	0,263
ПФК ¹ ₂₄ (мкг*ч /мл)	484,08 [404,5–604,4]	459,72 [433,6–556,01]	0,715	465,7 [399,5–605,3]	530,8 [480,2–603,4]	0,263	462,8 [450,4–548,5]	458,38 [413,8–553,5]	0,709
ПФК ² ₂₄ (мкг*ч /мл)	564,04 [409,5–751,9]	347,03 [267,43–479,99]	0,011	551,2 [397,02–786,6]	564,04 [421,9–721,58]	0,765	345,4 [255,5–393,2]	386,8 [273,8–481,5]	0,502

Примечание: 1 — через 48 ч от начала терапии; 2 — на момент завершения терапии.

Через 48 ч после начала АБТ
(первая проба)



На момент завершения АБТ
(вторая проба)

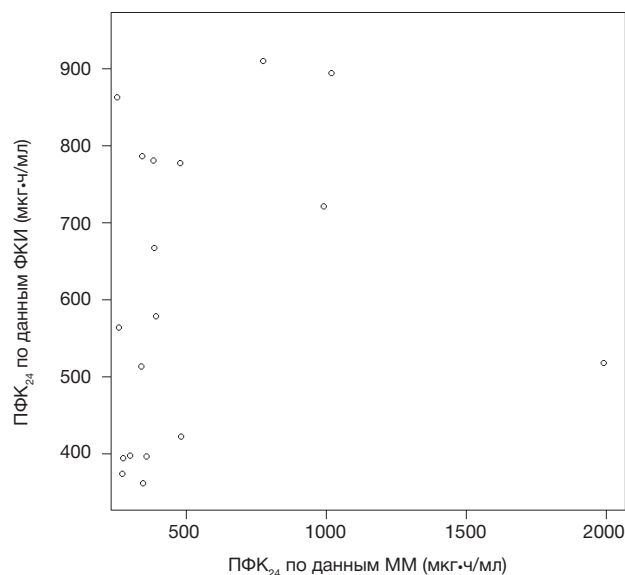


Рис. 1. Разброс значений ПФК_{24} , рассчитанных на основании ММ и на основании данных ФКИ, у пациентов с нарушениями функции почек в послеоперационном периоде через 48 ч и на момент завершения терапии ванкомицином

так и на момент завершения антибактериальной терапии (рис. 3). По данным корреляционного анализа была получена положительная корреляционная связь между значениями равновесных C_{trough} и $ПФК_{24}$ ($r = 0,964$; $p < 0,001$).

Прогнозирование вероятности достижения целевого отношения ФК/ФД

Полученные значения $ПФК_{24}$ в ходе ФКИ свидетельствуют о высокой вероятности достижения целевого отношения ФК/ФД ($ПФК_{24}/МПК > 400$) в случае, если $МПК = 1$ мкг/мл для *Staphylococcus aureus*. Исключение составляет группа пациентов, в которой значение равновесных C_{trough} было ниже 10 мкг/мл; в этом случае целевое отношение ФК/ФД было отмечено у 55% пациентов. В случае увеличения значений МПК до 1,5 и 2 мкг/мл вероятность достижения целевого отношения ФК/ФД в группе пациентов, где C_{trough}

был 10–15 мкг/мл, снижается до 30%, в группе, где C_{trough} составлял 15–20 мкг/мл — снижается до 70% (табл. 3). Гипотетически целевое отношение ФК/ФД при увеличении МПК до 2 мкг/мл возможно лишь в случае достижения C_{trough} 20 мкг/мл и выше (табл. 3).

При сравнении результатов прогнозирования отношения $ПФК_{24}/МПК$ у пациентов на момент завершения антибактериальной терапии, целевых значений ФК/ФД (> 400) в большинстве случаев достигали пациенты, у которых уровень C_{trough} был выше 10–15 мкг/мл (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования было выявлено, что при стандартном подходе к дозированию ванкомицина у пациентов хирургического профиля с острыми нарушениями функции почек фактические значения C_{trough} через 48 ч

Через 48 ч после начала АБТ (первая проба)

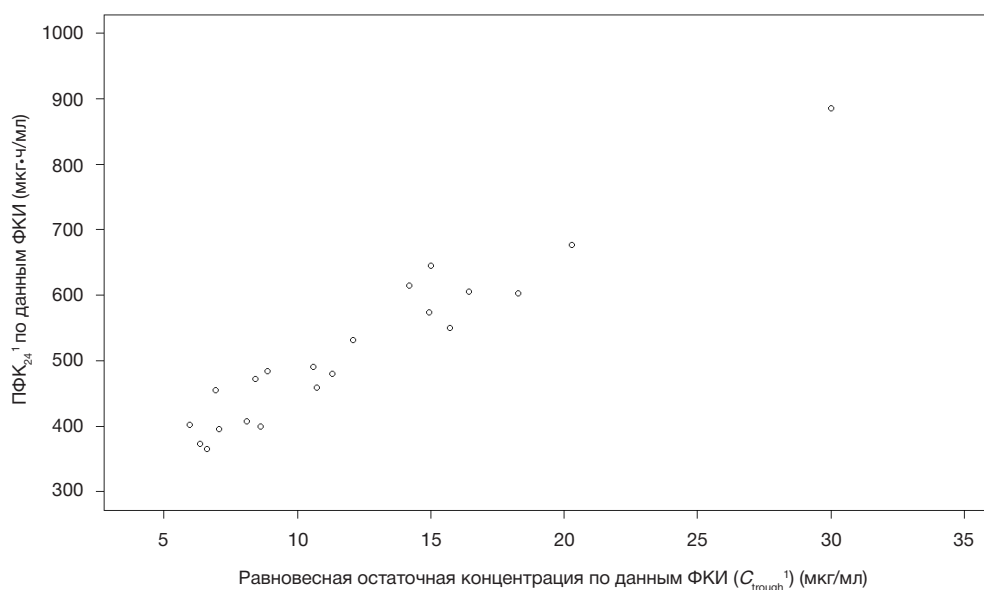


Рис. 2. Зависимость значения $ПФК_{24}^1$ от уровня равновесной C_{trough}^1 через 48 ч от начала антибактериальной терапии по данным ФКИ

На момент завершения АБТ (вторая проба)

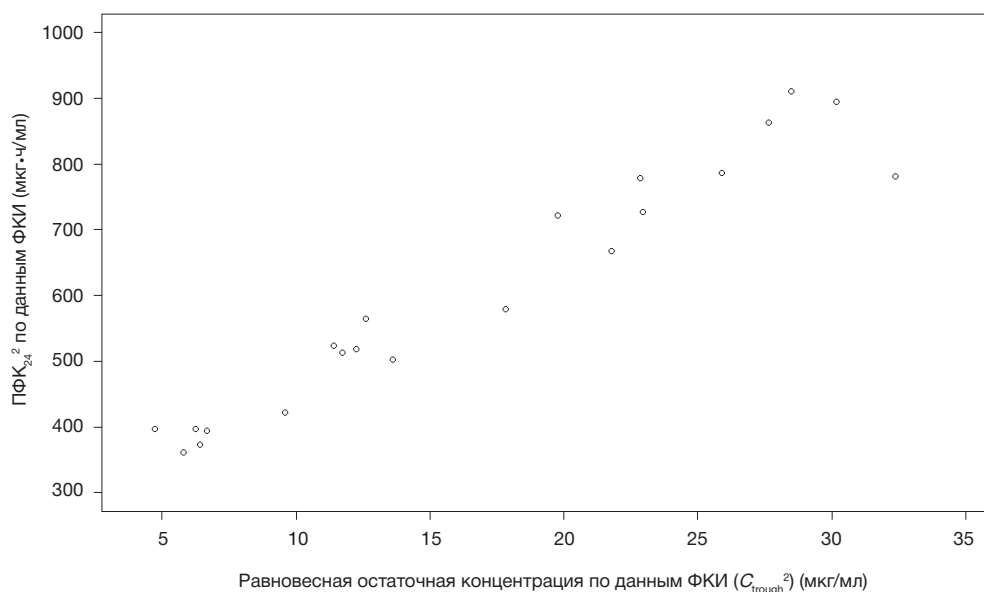


Рис. 3. Зависимость значения $ПФК_{24}^2$ от уровня равновесной C_{trough}^2 на момент завершения антибактериальной терапии по данным ФКИ

Таблица 3. Прогнозирование отношения ПФК₂₄/МПК для *Staphylococcus aureus* через 48 ч от начала терапии ванкомицином

Значение C_{trough} , мкг/мл	ПФК ₂₄ , мкг·ч/мл			ПФК ₂₄ /МПК > 400		
	М	min	max	МПК 1 мкг/мл (%)	МПК 1,5 мкг/мл (%)	МПК 2 мкг/мл (%)
< 10	401,9753	365,676	484,0849	55	0	0
10–15	530,8875	459,4124	645,6017	100	30	0
15–20	603,4062	549,4891	605,2955	100	70	0
> 20	780,6152	676,4806	884,7498	100	100	50

Таблица 4. Прогнозирование отношения ПФК₂₄/МПК для *Staphylococcus aureus* на момент завершения терапии ванкомицином

Значение C_{trough} , мкг/мл	ПФК ₂₄ , мкг·ч/мл			ПФК ₂₄ /МПК > 400		
	М	min	max	МПК 1 мкг/мл (%)	МПК 1,5 мкг/мл (%)	МПК 2 мкг/мл (%)
< 10	395,1776	361,2053	421,9468	16	0	0
10–15	517,7069	502,5894	564,0411	100	0	0
15–20	650,2483	578,911	721,5856	100	50	0
> 20	783,8409	667,7073	910,8016	100	100	38

от начала терапии достоверно отличались от значений по данным ММ (11,32 (8,1–16,4) и 16,59 (14,03–24,8) мкг/мл соответственно; $p = 0,004$).

Наши данные согласуются с результатами других исследований, в которых была отмечена высокая вариабельность параметров ФК, а также отношения ПФК₂₄/МПК > 400 у пациентов в отделениях интенсивной терапии, которым проводили антибактериальную терапию ванкомицином в стандартных дозах [15, 16].

Различия в результатах ФКИ и ММ могут быть связаны с рядом недостатков большинства математических моделей. В однокомпартментных ММ используют в основном для расчетов фиксированные значения V_d — среднюю величину 0,7 л/кг. По данным ФКИ вариабельность этого параметра составляет от 0,2 до 1,25 л/кг и зависит от объема циркулирующей крови, уровня альбумина и т. д. Для расчета K_{el} используют значение КК по Кокрофту–Голту. В настоящее время не существует идеальной формулы для оценки скорости элиминации лекарственного препарата по уровню эндогенного креатинина [17, 18].

Ряд авторов отмечают в своих исследованиях, что метод применения стандартных номограмм или ММ для предсказания параметров ФК имеет ряд ограничений. Во-первых, большинство этих методов были валидированы на ограниченной популяции здоровых добровольцев или пациентов в стабильном состоянии. Во-вторых, целевые значения равновесных C_{trough} рассматривались в пределах 5–10 мкг/мл. В настоящее время диапазон целевых концентраций вырос до 15–20 мкг/мл с учетом результатов микробиологических исследований [19, 20].

Другая актуальная тема для дискуссии — наличие необходимости достигать столь высоких значений C_{trough} и отношения ПФК₂₄/МПК на уровне 400 или выше. По данным локального микробиологического мониторинга при значениях МПК, равных 1 или < 1 мкг/мл, достижение диапазона C_{trough} 15–20 мкг/мл не обязательно [21].

В ходе ретроспективного исследования было показано, что более 30% пациентов достигали целевого отношения ПФК₂₄/МПК > 400 даже при C_{trough} ниже 15 мкг/мл. По данным регрессивного анализа значение C_{trough} на уровне 10,8 мкг/мл являлось предиктором достижения целевого отношения ПФК₂₄/МПК > 400 [22].

По данным нашего исследования у больных на фоне стандартных режимов дозирования ванкомицина была отмечена положительная клиничко-лабораторная динамика, хотя значения C_{trough} находились в пределах 10–15 мкг/мл (табл. 2). Достижение целевого отношения ПФК₂₄/МПК > 400 можно объяснить результатами микробиологического мониторинга в нашем ЛПУ (*S. aureus*, МПК ванкомицина < 1 мкг/мл в 60–70% случаев).

В ходе прогнозирования вероятности достижения целевого отношения ФК/ФД при повышении уровня МПК до 1,5 и 2 мкг/мл риск эффективности АБТ ванкомицином снижается в 30 и в 70% случаев.

Получены данные, что индивидуальное изменение режимов дозирования с помощью ММ на основе результатов расширенного ФКИ (C_{trough} , C_{peak} , ПФК₂₄) имело преимущество по сравнению с режимом дозирования по данным мониторинга C_{trough} [23].

Результаты ФКИ для особых групп пациентов необходимы для разработки ММ параметров ФК и определения оптимальных режимов дозирования ванкомицина. Данные этих исследований служат основой для создания популяционных математических моделей, что требует увеличения количества ФКИ у пациентов в различных когортах [24, 25].

ВЫВОДЫ

Результаты нашего исследования свидетельствуют о высокой вариабельности параметров ФК ванкомицина, полученных различными методами. Различия параметров ФК по данным ФКИ и ММ подтверждают необходимость ТЛМ у пациентов с нарушениями функции почек в послеоперационном периоде. Антибактериальная терапия ванкомицином с учетом C_{trough} по данным ТЛМ позволяет повысить безопасность терапии у больных с острыми нарушениями функции почек. Эффективность антибактериальной терапии ванкомицином ограничена чувствительностью возбудителя (МПК) и требует расчета отношения ПФК₂₄/МПК. Необходимо продолжить ФКИ ванкомицина у больных с острыми нарушениями функции почек в послеоперационном периоде для усовершенствования методики ММ в представленной когорте.

Литература

- Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R, Craig W, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases. *Am J Health Syst Pharm*. 2009 Jan 1; 66 (1): 82–98.
- Ye ZK, et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin: a guideline of the Division of Therapeutic Drug Monitoring. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Nov 11; 71 (11): 3020–25.
- Бондарева И. Б. Программное обеспечение для анализа данных ФК/ФД исследований. *Клиническая фармакокинетика*. 2005; 2 (3): 9–13.
- Brendel K, Dartois C, Comets E, et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet*. 2007; 46 (3): 221–34.
- Clinical Calculators [интернет]. Available from: <http://clincalc.com/Vancomycin>
- Lake KD, Peterson CD. A simplified dosing method for initiating vancomycin therapy. *Pharmacotherapy*. 1985 Nov-Dec; 5 (6): 340–44.
- Al-Kofide H, Zaghoul I, Al-Naim L. Pharmacokinetics of vancomycin in adult cancer patients. *J Oncol Pharm Pract*. 2010 Dec 16; 16(4): 245–250.
- Burton ME, Gentle DL, Vasko MR. Evaluation of a Bayesian method for predicting vancomycin dosing. *DICP*. 1989; 23 (4): 294–300.
- Khawaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*. 2012; 120 (4): 179–84.
- Инструкция по медицинскому применению [интернет]. Доступно по ссылке: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=80390ff0-c656-4e1b-a33e-a30232cccf1d&t=
- Hammett-Stabler CA, Johns T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. *Clin Chem*. 1998 May; 44 (5): 1129–40.
- Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017 Available from: <https://www.R-project.org>
- Bauer LA. Applied clinical pharmacokinetics. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 26–49.
- Matzke GR, McGory RW, Halstenson CE, Keane WF. Pharmacokinetics of vancomycin in patients with various degrees of renal function. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984 Apr; 25 (4): 433–7.
- Patel N, Pai MP, Rodvold KA, Lomaestro B, Drusano GL, Lodise TP. Vancomycin: we can't get there from here. *Clin Infect Dis*. 2011 Apr 15; 52 (8): 969–74.
- Bel KA, Bourguignon L, Marcos M, Ducher M, Goutelle S. Is trough concentration of vancomycin predictive of the area under the curve? A clinical study in elderly patients. *Ther Drug Monit*. 2017 Feb; 39 (1): 83–7.
- Moise-Broder PA, Forrest A, Birmingham MC, et al. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clin Pharmacokinet*. 2004; 43 (13): 925–42.
- Paglalunga S, Offman E, Ichhpurani N, Marbury TC, Morimoto BH. Update and trends on pharmacokinetic studies in patients with impaired renal function: practical insight into application of the FDA and EMA guidelines. *Expert review of clinical pharmacology*. 2017; 10 (3): 273–83.
- Prybylski JP. Vancomycin Trough Concentration as a Predictor of Clinical Outcomes in Patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis of Observational Studies. *Pharmacotherapy*. 2015 Oct; 35 (10): 889–98.
- Murphy JE, Gillespie DE, Bateman CV. Predictability of vancomycin trough concentrations using seven approaches for estimating pharmacokinetic parameters. *Am J Health Syst Pharm*. 2006 Dec 1; 63 (23): 2365–70.
- del Mar Fernández de Gatta García M, Revilla N, Calvo MV, Domínguez-Gil A, Sánchez Navarro A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of vancomycin in ICU patients. *Intensive Care Med*. 2007 Feb; 33 (2): 279–85.
- Neely MN, Youn G, Jones B, Jelliffe RW, Drusano GL, Rodvold KA, et al. Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58 (1): 309–16.
- Pai MP, Neely M, Rodvold KA, Lodise TP. Innovative approaches to optimizing the delivery of vancomycin in individual patients. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Nov 20; 77: 50–7.
- Purwonugroho TA, Chulavatnatol S, Preechagoon Y, Chindavijak B, Malathum K, Bunuparadah P. Population pharmacokinetics of vancomycin in Thai patients. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:762649. DOI: 10.1100/2012/762649.
- Zalloum N, Saleh MI, Al Haj M, Balbisi M, Al-Ghazawi M. Population pharmacokinetics of vancomycin in Jordanian patients *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2018; 17 (2): 351–58.

References

- Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R, Craig W, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases. *Am J Health Syst Pharm*. 2009 Jan 1; 66 (1): 82–98.
- Ye ZK, et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin: a guideline of the Division of Therapeutic Drug Monitoring. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Nov 11; 71 (11): 3020–25.
- Bondareva I. B. Programmnnoe obespechenie dlya analiza dannyh FK/FD issledovaniy. *Klinicheskaya farmakokinetika*. 2005; 2 (3): 9–13.
- Brendel K, Dartois C, Comets E, et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet*. 2007; 46 (3): 221–34.
- Clinical Calculators [internet]. Available from: <http://clincalc.com/Vancomycin>.
- Lake KD, Peterson CD. A simplified dosing method for initiating vancomycin therapy. *Pharmacotherapy*. 1985 Nov-Dec; 5 (6): 340–44.
- Al-Kofide H, Zaghoul I, Al-Naim L. Pharmacokinetics of vancomycin in adult cancer patients. *J Oncol Pharm Pract*. 2010 Dec 16; 16 (4): 245–250.
- Burton ME, Gentle DL, Vasko MR. Evaluation of a Bayesian method for predicting vancomycin dosing. *DICP*. 1989; 23 (4): 294–300.
- Khawaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*. 2012; 120 (4): 179–84.
- Instrukciya po medicinskomu primeniyu [internet]. Available from: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=80390ff0-c656-4e1b-a33e-a30232cccf1d&t=.
- Hammett-Stabler CA, Johns T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. *Clin Chem*. 1998 May; 44 (5): 1129–40.
- Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017 Available from: <https://www.R-project.org>.
- Bauer LA. Applied clinical pharmacokinetics. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 26–49.
- Matzke GR, McGory RW, Halstenson CE, Keane WF. Pharmacokinetics of vancomycin in patients with various

- degrees of renal function. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984 Apr;25(4):433–7.
15. Patel N, Pai MP, Rodvold KA, Lomaestro B, Drusano GL, Lodise TP. Vancomycin: we can't get there from here. *Clin Infect Dis.* 2011 Apr 15; 52 (8): 969–74.
 16. Bel KA, Bourguignon L, Marcos M, Ducher M, Goutelle S. Is trough concentration of vancomycin predictive of the area under the curve? A clinical study in elderly patients. *Ther Drug Monit.* 2017 Feb; 39 (1): 83–7.
 17. Moise-Broder PA, Forrest A, Birmingham MC, et al. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43 (13): 925–42.
 18. Paglialunga S, Offman E, Ichhpurani N, Marbury TC, Morimoto BH. Update and trends on pharmacokinetic studies in patients with impaired renal function: practical insight into application of the FDA and EMA guidelines. *Expert review of clinical pharmacology.* 2017; 10 (3): 273–83.
 19. Prybylski JP. Vancomycin Trough Concentration as a Predictor of Clinical Outcomes in Patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis of Observational Studies. *Pharmacotherapy.* 2015 Oct; 35 (10): 889–98.
 20. Murphy JE, Gillespie DE, Bateman CV. Predictability of vancomycin trough concentrations using seven approaches for estimating pharmacokinetic parameters. *Am J Health Syst Pharm.* 2006 Dec 1; 63 (23): 2365–70.
 21. del Mar Fernández de Gatta Garcia M, Revilla N, Calvo MV, Domínguez-Gil A, Sánchez Navarro A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of vancomycin in ICU patients. *Intensive Care Med.* 2007 Feb; 33 (2): 279-85.
 22. Neely MN, Youn G, Jones B, Jelliffe RW, Drusano GL, Rodvold KA, et al. Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (1): 309–16.
 23. Pai MP, Neely M, Rodvold KA, Lodise TP. Innovative approaches to optimizing the delivery of vancomycin in individual patients. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Nov 20;77:50–7.
 24. Purwonugroho TA, Chulavatnatol S, Preechagoon Y, Chindavijak B, Malathum K, Bunuparadah P. Population pharmacokinetics of vancomycin in Thai patients. *The Scientific World Journal.* 2012;2012:762649. DOI: 10.1100/2012/762649.
 25. Zalloum N, Saleh MI, Al Haj M, Balbisi M, Al-Ghazawi M. Population pharmacokinetics of vancomycin in Jordanian patients *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2018; 17 (2): 351–58.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА МРТ СЕРДЦА В ДИАГНОСТИКЕ ДИСФУНКЦИОНАЛЬНОГО МИОКАРДА

Я. К. Рустамова¹✉, Г. Г. Иманов², В. А. Азизов¹

¹Кафедра внутренних болезней №2, Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан

²Кафедра внутренних болезней №1, Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан

Эффективность метода МРТ сердца в диагностике дисфункционального миокарда в настоящее время до конца не изучена. Это обусловлено тем, что доказательная база основана преимущественно на обсервационных исследованиях, которые отличаются разнородностью изучаемых групп по нозологическим формам, что не позволяет убедительно интерпретировать полученные результаты. Целью исследования была оценка эффективности методов визуализации дисфункционального миокарда у 144 пациентов, перенесших инфаркт миокарда и имеющих многососудистое поражение коронарного русла и сниженную фракцию выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ). Для визуальной оценки дисфункционального миокарда всем участникам исследования выполняли стресс-эхокардиографию и МРТ сердца. Критерии оценки эффективности диагностических методов включали: а) количество сегментов с нарушенной кинетикой; б) глубину поражения (индекс трансмуральности); в) объем контрастируемого миокарда в пределах сегмента. По результатам исследования, на одного пациента, в среднем, приходилось $2,72 \pm 0,82$ сегмента с нарушенной кинетикой. При выполнении МРТ сердца выявлялось достоверно большее количество сегментов с нарушенной сократимостью. Средняя разница по количеству сегментов составила 63 сегмента (56; 82) при 95% ДИ, $p < 0,01$. Выявлено, что с увеличением индекса трансмуральности по толщине уменьшается количество сегментов с гипокинезом ($r = -0,78$; $p = 0,0314$) и увеличивается количество сегментов с акинезом ($r = -0,84$; $p = 0,0282$), что особенно важно учитывать при выборе тактики лечения таких пациентов. Можно предположить, что МРТ сердца является более эффективным и чувствительным методом диагностики дисфункционального миокарда и позволяет определять достоверно большее количество сегментов с нарушенной сократимостью, по сравнению с методом стресс-эхокардиографии. Методика отсроченного контрастирования позволяет оценить глубину и распространенность кардиального фиброза, что особенно важно учитывать при выборе стратегии лечения больных с дисфункциональным миокардом.

Ключевые слова: дисфункциональный миокард, МРТ сердца, стресс-эхокардиография с добутамином

✉ Для корреспонденции: Ясмин Кямрановна Рустамова
Ул. Бакиханова, д. 23, г. Баку, Азербайджан, AZ1022; yasmin.rst@gmail.com

Статья получена: 16.01.2018 Статья принята к печати: 20.06.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.042

EVALUATION OF CARDIAC MRI EFFICACY IN THE DIAGNOSIS OF HIBERNATING MYOCARDIUM

Rustamova YK¹✉, Imanov GG², Azizov VA¹

¹Department of Internal Diseases No 2, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

²Department of Internal Diseases No 1, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

The efficacy of cardiac MRI in the diagnosis of hibernating myocardium remains understudied. The existing body of evidence on this matter comes mainly from observational studies carried out in heterogenous (in terms of cardiac pathology) cohorts of patients, which complicates the interpretation of the results. The aim of our study was to evaluate the efficacy of cardiac imaging techniques in 144 patients with a history of myocardial infarction, multivessel coronary artery disease and a low ejection fraction of the left ventricle. All participants underwent stress echocardiography and cardiac MRI examinations. The following parameters were factored into: a) the number of identified segments with abnormal myocardial contractility; b) the transmural index (scar thickness); c) the volume of the viable myocardium relative to its total mass. The study revealed that on average there were 2.72 ± 0.82 segments with contractile dysfunction per patient. Cardiac MRI was able to detect significantly more hibernating segments than stress echocardiography. On average, the difference in the number of detected segments was 36 (56; 86) at 95% CI and $p < 0.01$. We established that as the transmural index increases, the number of hypokinetic segments decreases ($r = -0.78$; $p = 0.0314$) while the number of akinetic segments ($r = -0.84$; $p = 0.0282$) goes up. This needs to be accounted for when selecting a treatment strategy for such patients. We conclude that cardiac MRI is a more effective and sensitive diagnostic technique in patients with hibernating myocardium that allows detecting significantly more cardiac segments with contractile dysfunction than stress echocardiography. Delayed contrast enhancement is instrumental in estimating the thickness and extent of cardiac fibrosis, the parameters that should be accounted for when deciding on the treatment strategy in such patients.

Keywords: hibernating myocardium, cardiac MRI, dobutamine stress echocardiography

✉ Correspondence should be addressed: Yasmin K. Rustamova
Bakikhanova 23, Baku, Azerbaijan, AZ1022; yasmin.rst@gmail.com

Received: 16.01.2018 Accepted: 20.06.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.042

Прогноз заболевания у больных с дисфункциональным миокардом после перенесенного инфаркта напрямую зависит от сроков выполнения и точности диагностических методов, которые применяются для этих целей. К таким методам можно отнести стресс-эхокардиографию с добутамином, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОЭКТ), позитронно-эмиссионную (ПЭТ) и магнитно-резонансную томографию (МРТ) [1].

ПЭТ обладает большой прогностической ценностью у пациентов с выраженной сердечной недостаточностью и низкой фракцией выброса. К особенностям ПЭТ наряду с ОЭКТ, следует отнести возможность коррекции ослабления фотонного излучения мягкими тканями и получения количественной оценки оборота меченых соединений. Благодаря высокой энергии позитронов высококачественные изображения удается получать даже у пациентов с избыточной массой тела [2].

Однако ряд недостатков этой методики препятствует ее широкому клиническому применению: прежде всего высокая стоимость, а также тот факт, что большинство изотопов для ПЭТ являются ультракороткоживущими и, следовательно, времени на их производство и доставку мало. В связи с этим, такие изотопы вырабатывают на месте проведения исследования или вблизи него.

Говоря о возможностях радионуклидных методов оценки состояния миокарда, таких как ОЭКТ, следует отметить, что они не позволяют достоверно дифференцировать пациентов с неблагоприятным прогнозом. В первую очередь, это вызвано тем, что так и не удалось создать эмиссионный томограф с пространственным разрешением, хотя бы сравнимым с тем, что рутинно достигается при ультразвуковых, рентгеновских и магнитно-резонансных томографических исследованиях. При разрешении томографа 6 мм эти методики помогают сконцентрироваться на клинически значимых нарушениях перфузии и метаболизма. Тем не менее радионуклидные методы, в отличие от методов компьютерной томографии и МРТ, позволяют исследовать миокард только посегментно, а не послойно [3]. Кроме того, используемые в настоящее время радиофармпрепараты служат неспецифичными маркерами перфузии как для рубцовой, так и для жизнеспособной миокардиальной ткани.

Метод стресс-эхокардиографии с добутамином имеет относительно низкую себестоимость и прост в технике проведения по сравнению с другими способами визуализации сердца. Сопоставление результатов стресс-эхокардиографии с добутамином и ОЭКТ, полученных после успешной реваскуляризации, свидетельствует о примерно одинаковой чувствительности методов (74–100%). Однако специфичность радионуклидных методов ниже (40–55%) по сравнению со стресс-эхокардиографией (77–95%). В то же время при стресс-эхокардиографии обычно недооценивается степень жизнеспособности миокарда, которая выявляется радионуклидными методами [4–7].

С учетом того что при проведении стресс-эхокардиографии (определение жизнеспособности миокарда) и радионуклидных методов (оценка состояния мембран кардиомиоцитов) используются различные критерии, их можно рассматривать как взаимодополняющие методы, а в некоторых случаях целесообразно их совместное применение.

Методологической особенностью современной МРТ является сочетание полной безвредности метода с высоким пространственным разрешением получаемых изображений, что принципиально отличает МРТ от радионуклидных методов [8].

В настоящее время при выполнении МРТ используют протоколы как прямой синхронизации с ЭКГ визуализирующих процессов сокращения и расслабления миокарда, так и детальной пространственной визуализации анатомических особенностей миокарда вплоть до дифференцировки по различным его слоям и анатомическим составляющим [9]. Кроме того, имеется возможность количественно и качественно описать регионарную сократимость левого и правого желудочков, что свидетельствует о величине объема неповрежденной сердечной мышцы и служит важным прогностическим критерием течения ишемической болезни сердца (ИБС), особенно если речь идет о предстоящей реваскуляризации миокарда [10, 11].

Методика отсроченного контрастирования с помощью парамагнетиков позволяет получить представление о наличии фиброза и постинфарктных рубцов в миокарде, возникших вследствие ишемии, воспаления и дистрофии. Она хорошо подходит для визуальной оценки локализации, распространенности необратимо поврежденного и жизнеспособного миокарда при остром инфаркте и постинфарктном кардиосклерозе, а также для отслеживания динамики формирования рубца [12, 13].

За счет хорошего пространственного и временного разрешения МРТ сердца в настоящее время признается методом «золотого стандарта» в оценке глобальной сократительной функции ЛЖ, а также при выявлении локальных нарушений сократимости сердечной мышцы [14].

Однако, согласно действующим рекомендациям Европейского общества кардиологов по реваскуляризации миокарда 2014 г., современные визуализирующие методы с высоким пространственным разрешением, в том числе МРТ сердца, рекомендуются лишь для верификации ишемии миокарда у пациентов с умеренной претестовой вероятностью выраженной ИБС (15–85%), а также объема рубцовой ткани и сократительного резерва. При этом отмечено, что в отношении определения жизнеспособности миокарда и прогнозирования степени восстановления сократимости стенки сердца диагностическая точность МРТ сопоставима с другими методами (ПЭТ, ОЭКТ, стресс-эхокардиография с добутамином) [15].

Следует отметить, что существующая доказательная база основана преимущественно на наблюдательных исследованиях и результатах мета-анализов, тогда как рандомизированные исследования по изучению данного вопроса проводились только для метода ПЭТ. Кроме того, описанные в настоящее время клинические исследования эффективности методики МРТ сердца различаются разнородностью изучаемых групп по нозологическим формам, что не позволяет убедительно интерпретировать полученные результаты.

Учитывая изложенное, представляется целесообразным проведение новых исследований, направленных на изучение эффективности современных методов визуализации дисфункционального миокарда и влияния их на выбор тактики лечения у однородной когорты пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на клинических базах кафедры внутренних болезней № 2 Азербайджанского медицинского университета (г. Баку) и кафедры госпитальной хирургии с курсом детской хирургии Российского университета дружбы народов (г. Москва).

Критерии включения: инфаркт миокарда в анамнезе; стенокардия II–III функционального класса (по Канадской классификации); многососудистое поражение коронарного русла по данным цифровой ангиографии (SYNTAXscore до 32 баллов); наличие сегментов с нарушенной локальной сократимостью миокарда левого желудочка; недостаточность кровообращения I–III функционального класса (по классификации NYHA); фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) менее 50%.

Критерии исключения: острый коронарный синдром; техническая невозможность проведения эндоваскулярного вмешательства; клаустрофобия; имплантированный электрокардиостимулятор/кардиовертер-дефибриллятор.

Всем больным выполняли коронарографию, по результатам которой было рекомендовано определение жизнеспособности миокарда в бассейнах окклюзированных артерий методом стресс-эхокардиографии с добутином по стандартной методике.

Оценку локальной сократимости проводили по 4-балльной шкале 17-сегментарной модели с расчетом индекса нарушения региональной сократимости. Индекс рассчитывали как отношение суммы баллов нарушения локальной сократимости каждого сегмента левого желудочка к количеству анализируемых сегментов: нормокинез — 1 балл; гипокинез — 2 балла, акинез — 3 балла, дискинез — 4 балла.

Жизнеспособными считали сегменты с улучшением показателя локальной сократимости на 1 балл и более. Пробу считали отрицательной, если отсутствовал прирост систолического утолщения миокарда при малых дозах добутина (5–10 мг/кг/мин) или ухудшалась сократимость миокарда на фоне введения больших доз (20–40 мг/кг/мин).

Для визуальной оценки дисфункционального миокарда всем пациентам, участвовавшим в исследовании, выполняли стресс-эхокардиографию и МРТ сердца с целью последующего анализа эффективности каждого из указанных методов.

Для оценки эффективности диагностических методов использовали следующие критерии: а) количество выявленных сегментов с нарушенной кинетикой; б) глубину поражения (индекс трансмуральности); в) определяемый объем жизнеспособного миокарда относительно общей массы миокарда.

МРТ сердца выполняли на томографе Magnetom Essenza (Siemens; Германия) с индукцией магнитного поля 1,5 Т, снабженного системой синхронизации с ЭКГ.

Все этапы сканирования выполняли при задержке пациентом дыхания на выдохе длительностью 6–12 с, в зависимости от типа применяемой импульсной последовательности. Внутривенную инъекцию контрастного вещества производили после получения ориентировочных срезов, серий киноизображений и T1-, T2-взвешенных изображений, необходимых для оценки морфологии сердца.

В качестве контрастирующего агента для выявления постинфарктных рубцовых изменений в отсроченную фазу применяли гадолиниевый парамагнитный контрастный препарат, который вводили ручным способом.

Спустя 10–15 мин после введения контрастного препарата в дозировке 2 мл 0,5 М раствора на 10 кг массы тела оценивали его накопление в миокарде как по толщине, так и по объему относительно миокарда в данном сегменте (соответственно расположению сегментов миокарда ЛЖ при эхокардиографии). Каждый кадр из серии изображений отличался от предыдущего по параметру времени инвертирующего импульса на 10 мс.

Изображения, полученные в режиме «инверсия–восстановление», также подвергали тщательному анализу на предмет определения локализации и распространенности постинфарктных рубцовых изменений. Они имели вид гиперинтенсивных однородных участков задержки вымывания контрастного препарата с четкими контурами и типичной субэндокардиальной локализацией.

С помощью пакета прикладных программ CVI 42 (Circle), а также CAAS MRV, на срезах по короткой оси левого желудочка полуавтоматически оценивали геометрические показатели сердца (массу миокарда, объем ЛЖ), а также проводили детальную оценку сократимости миокарда ЛЖ, процентного содержания рубцовой ткани и жизнеспособного, не накопившего контраст, миокарда.

Оценивали индекс трансмуральности по толщине — соотношение максимальной толщины включения парамагнетика и толщины миокарда в данном сегменте, а также объем контрастируемого миокарда в пределах сегмента (%).

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ MS Statistica 10.0. Применяли методы дисперсионного, корреляционного,

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика пациентов

Показатель	n = 144	
	Абс.	%
Мужчин	96	66,7
Женщин	48	33,3
Средний возраст	58,4 ± 9,8	
Средняя длительность ПИКС, мес.	7,7 ± 3,3	
Стенокардия 2 ФК	52	36,1
Стенокардия 3 ФК	60	41,7
Стенокардия 4 ФК	32	22,2
Гипертоническая болезнь	108	75
Сахарный диабет 2 типа	32	22,2
Недостаточность кровообращения (NYHA)		
I ФК	19	13,2
II ФК	90	62,5
III ФК	35	24,3
Курение	76	52,8
Гиперхолестеринемия	98	68,1
ОНМК в анамнезе	12	8,3
Нарушения ритма и проводимости сердца	78	54,2

Примечание: ФК — функциональный класс, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения.

Таблица 2. Ангиографическая характеристика пациентов

Тип поражения	n = 144	
	Абс.	%
Двухсосудистое поражение	48	33,3
Трехсосудистое поражение	56	38,9
Бифуркационные стенозы	28	19,4
Устьевые стенозы	12	8,3
Анатомическая характеристика		
Стеноз ПНА	70	48,6
Стеноз ОА	32	22,2
Стеноз ПКА	42	29,2

Примечание: ПНА — передняя нисходящая артерия; ОА — огибающая артерия; ПКА — правая коронарная артерия.

регрессионного, дискриминантного анализа и анализа сопряженности с использованием параметрических и непараметрических критериев. Для анализа сопряженности применяли критерий χ^2 Пирсона, а для множественного сравнения использовали F-критерий и критерий Ньюмена–Кейлса. Количественные признаки сравнивали с применением теста Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в исследовании участвовали 144 пациента. Временной интервал от момента возникновения инфаркта миокарда (ИМ) до включения в исследование составлял от 3 до 18 месяцев (в среднем $7,7 \pm 3,3$ месяца).

Клинико-демографическая и ангиографическая характеристика пациентов представлена в табл. 1 и 2.

Количество сегментов с нарушенной сократительной способностью, выявленных на этапе обследования пациентов, в зависимости от используемого метода диагностики представлено в табл. 3.

В среднем, на одного пациента пришлось $2,72 \pm 0,82$ сегмента с нарушенной кинетикой. При выполнении МРТ сердца было выявлено достоверно большее количество сегментов с нарушенной сократимостью, при этом по количеству выявленных сегментов с гипокинезом и акинезом также получены достоверные различия по сравнению с методом стресс-эхокардиографии. Средняя разница по количеству сегментов составила 63 сегмента (56; 86) при 95% ДИ, $p < 0,01$.

При выполнении МРТ сердца с отсроченным контрастированием оценивали индекс трансмуральности по толщине и объем контрастируемого миокарда в пределах сегмента. В зависимости от полученных значений индекса пациенты были условно разделены на подгруппы: 0,3–0,4 — пациенты с субэндокардиальным типом накопления парамагнетика ($n = 25$); 0,4–0,5 — с интрамуральным типом накопления (постинфарктный

фиброз) ($n = 107$); более 0,5 — с трансмуральным типом ($n = 12$).

По объему контрастирования миокарда в пределах сегмента (величина кардиосклероза в процентах) можно выделить следующие группы: 20–30% ($n = 54$); 30–40% ($n = 52$); 40–50% ($n = 23$); более 50% ($n = 12$).

В исследовании выявлена отрицательная корреляция между глубиной поражения миокарда и видом нарушения локальной сократимости (табл. 4). Так, с увеличением индекса трансмуральности по толщине уменьшается количество сегментов с гипокинезом ($r = -0,78$; $p = 0,0314$) и увеличивается количество сегментов с акинезом ($r = -0,84$; $p = 0,0282$), что особенно важно учитывать при выборе тактики лечения таких пациентов.

Следует отметить, что нами не выявлена корреляция между величиной кардиосклероза (объемом контрастируемого миокарда в пределах сегмента) и показателями глобальной сократимости миокарда (табл. 5), в связи с чем, можно полагать, что величина (объем) кардиосклероза не влияет на показатели глобальной сократимости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величина кардиосклероза у больных, перенесших инфаркт миокарда, служит объективным прогностическим критерием, особенно когда речь идет о предстоящей операции реваскуляризации миокарда и о вероятности улучшения состояния пациента после хирургического вмешательства [10].

При определении тактики реваскуляризации учитываются и постинфарктные структурные изменения миокарда в виде формирования аневризмы желудочка и пристеночного тромба, что также позволяет определиться с решением вопроса о целесообразности вмешательства на коронарных артериях. Нет смысла восстанавливать кровоток в зоне обширного постинфарктного рубца, который не будет функционировать. Вместе с тем

Таблица 3. Количество сегментов с нарушенной локальной сократимостью

Вид нарушения локальной кинетики	Количество сегментов		Количество несовпадений	p
	МРТ сердца	Стресс-эхокардиография		
Гипокинез	224	186	38	0,002
Акинез	175	154	21	0,024
Дискинез	6	8	2	0,322
Всего:	405	348	61	0,017

Примечание: при $p < 0,05$ — показатели различаются достоверно.

Таблица 4. Корреляционный анализ глубины поражения миокарда и нарушения локальной сократимости

Вид нарушения сократимости	Величина индекса трансмуральности по толщине			p
	0,3–0,4 ($n = 25$)	0,4–0,5 ($n = 107$)	более 0,5 ($n = 12$)	
Гипокинез ¹	65	142	17	0,0314
Акинез ²	8	169	28	0,0282

Примечание: $r^1 = -0,78$; $r^2 = -0,84$.

Таблица 5. Корреляционный анализ величины кардиосклероза (%) и показателей глобальной сократительной функции миокарда

Показатели глобальной сократимости миокарда	Объем контрастируемого миокарда в пределах сегмента (%)				p
	20–30 ($n = 54$)	30–40 ($n = 52$)	40–50 ($n = 23$)	более 50 ($n = 12$)	
КДО (мл)	$149,2 \pm 3,7$	$146,4 \pm 3,2$	$150,8 \pm 3,3$	$154,2 \pm 3,8$	0,632
КСО (мл)	$71,4 \pm 0,9$	$68,2 \pm 0,7$	$68,8 \pm 0,8$	$64,8 \pm 0,8$	0,824

Примечание: для КДО $r = 0,01$; для КСО $r = 0,01$.

необходимо определить объем миокарда, который с большой долей вероятности после реваскуляризации восстановит свою сократительную функцию [13, 15].

Несмотря на относительную безопасность, а также высокую информативность, получаемую при оценке морфофункциональных параметров сердца и структурных изменений миокарда, метод МРТ сердца не нашел широкого применения и до настоящего времени является лишь дополнительным методом для определения стратегии и тактики реваскуляризации при сложных спорных ситуациях.

В представленном исследовании анализировали результаты визуализации дисфункционального миокарда с помощью двух современных информативных методов — стресс-эхокардиографии и МРТ сердца у одной когорты пациентов, перенесших инфаркт миокарда, которым своевременно не была выполнена реваскуляризация симптом-связанной артерии и имеющих многососудистое поражение коронарного русла на фоне снижения глобальной сократительной способности миокарда.

Полученные данные о глубине и распространенности кардиосклероза позволили провести корреляционный анализ с видами нарушения кинетики миокарда и показателями глобальной сократительной способности. Указанные показатели диагностики чрезвычайно важны для определения их на этапе обследования и подготовки

больного к хирургической реваскуляризации миокарда, так как позволяют выбрать оптимальную стратегию лечения больных с дисфункциональным миокардом.

ВЫВОДЫ

МРТ-сердца является эффективным и чувствительным методом диагностики дисфункционального миокарда и позволяет определять достоверно большее количество сегментов с нарушенной сократимостью, по сравнению с методом стресс-эхокардиографии. Методика отсроченного контрастирования позволяет оценить глубину и распространенность кардиосклероза, визуализировать нетрансмуральное повреждение миокарда, порой весьма деликатное, до 2–3 мм в толщину субэндокардиально, что невозможно определить при выполнении стресс-эхокардиографии. Выявленная отрицательная корреляция между глубиной поражения миокарда и видом нарушения локальной сократимости показывает, что с увеличением индекса трансмуральности по толщине уменьшается количество сегментов с гипокинезом и увеличивается количество сегментов с акинезом. При этом взаимосвязи между величиной кардиосклероза (объемом контрастируемого миокарда в пределах сегмента) и показателями глобальной сократимости миокарда (конечно-диастолический и конечно-систолический объемы) не обнаружено.

Литература

1. Kwon DH, Hachamocitch R, Popovic ZB. et al. Survival in patients with severe ischemic cardiomyopathy undergoing revascularization versus medical therapy: association with end-systolic volume and viability. *Circulation*. 2012; (126): 3–8.
2. Рыжкова Д. В., Костина И. С. Магнитно-резонансная и позитронно-эмиссионная томография сердца в прогнозировании обратимости локальной функции левого желудочка у больных с хроническими окклюзиями коронарных артерий. *Российский кардиологический журнал*. 2014; 2 (106): 72–8.
3. Camici PG, Kumak SP, Rimoldi OE. Stunning, Hibernating and Assessment of Myocardial Viability. *Circulation*. 2008; (117): 103–14.
4. Nagel E, Schuster A. Shortening without contraction: new insights into hibernating myocardium. *J Am Coll Cardiol Img*. 2010; (3): 731–33.
5. Алехин М. Н., Божьев А. М., Морозова Ю. А. и др. Стресс-эхокардиография с добутином в диагностике жизнеспособности у больных с реваскуляризацией миокарда. *Кардиология*. 2000; (12): 44–9.
6. Ling LH, Marwick TH, Flores DR, et al. Identification of therapeutic benefit from revascularization in patients with left ventricular systolic dysfunction: inducible ischemia versus hibernating myocardium. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013; (6): 363–72.
7. Hickman M, Chelliah R, Burden L, Senior R. Resting myocardial blood flow, coronary flow reserve, and contractile reserve in hibernating myocardium: implications for using resting myocardial contrast echocardiography vs. dobutamine echocardiography for the detection of hibernating myocardium. *Eur J Echocardiogr*. 2010; 11 (9): 756–62.
8. Усов В. Ю., Архангельский В. А., Федоренко Е. В. Оценка жизнеспособности поврежденного миокарда у кардиохирургических больных: сравнение возможностей магнитно-резонансной и эмиссионной томографии. *Комплексные проблемы сердечно – сосудистых заболеваний*. 2014; (3): 124–33.
9. Arai AE. The cardiac magnetic resonance approach to assessing myocardial viability. *J Nucl Cardiol*. 2011; 18 (6): 1095–102.
10. Труфанов Г. Е., Рудь С. Д., Железняк С. Е. МРТ в диагностике ишемической болезни сердца: учебное пособие. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2012. 63 с.
11. Коков А. Н., Масенко В. Л., Семенов С. Е., Барбараш О. Л. МРТ сердца в оценке постинфарктных изменений и ее роль в определении тактики реваскуляризации миокарда. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2014; (3): 97–102.
12. Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2010; (121): 692–705.
13. West AM, Kramer CM. Cardiovascular magnetic resonance imaging of myocardial infarction, viability and cardiomyopathies. *Curr Probl Cardiol*. 2010; (35): 176–220.
14. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2014; (35): 2541–619.
15. Kramer CM, Schulz-Menger J, Bluemke DA. et al. Standardized cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR) protocols, society for cardiovascular magnetic resonance: board of trustee's task force on standardized protocols. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013; 15 (1): 35.

References

1. Kwon DH, Hachamocitch R, Popovic ZB. et al. Survival in patients with severe ischemic cardiomyopathy undergoing revascularization versus medical therapy: association with end-systolic volume and viability. *Circulation*. 2012; (126): 3–8.
2. Ryzhkova DV, Kostina IS. Magnitno-rezonansnaja i pozitronno-jejmionnaja tomografija serdca v prognozirovanii obratimosti lokal'noj funkcii levogo zheludochka u bol'nyh s hronicheskimi okkluzijami koronarnyh arterij. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*.

- 2014; 2 (106): 72–8.
3. Camici PG, Krumholz SP, Rimoldi OE. Stunning, Hibernating and Assessment of Myocardial Viability. *Circulation*. 2008; (117): 103–14.
4. Nagel E, Schuster A. Shortening without contraction: new insights into hibernating myocardium. *J Am Coll Cardiol Img*. 2010; (3): 731–33.
5. Alehin MN, Bozhev AM, Morozova Ju A i dr. Stress-jehokardiografija s dobutaminom v diagnostike zhiznesposobnosti u bol'nyh s revaskulizaciej miokarda. *Kardiologija*. 2000; (12): 44–9.
6. Ling LH, Marwick TH, Flores DR, et al. Identification of therapeutic benefit from revascularization in patients with left ventricular systolic dysfunction: inducible ischemia versus hibernating myocardium. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013; (6): 363–72.
7. Hickman M, Chelliah R, Burden L, Senior R. Resting myocardial blood flow, coronary flow reserve, and contractile reserve in hibernating myocardium: implications for using resting myocardial contrast echocardiography vs. dobutamine echocardiography for the detection of hibernating myocardium. *Eur J Echocardiogr*. 2010; (119): 756–62.
8. Usov VJu, Arhangel'skij VA, Fedorenko EV. Ocenka zhiznesposobnosti povrezhden'nogo miokarda u kardiokirurgicheskikh bol'nyh: sravnenie vozmozhnostej magnitno-rezonansnoj i jemissionnoj tomografii. *Kompleksnye problemy serdechno – sosudistykh zabolevanij*. 2014; (3): 124–33.
9. Arai AE. The cardiac magnetic resonance approach to assessing myocardial viability. *J Nucl Cardiol*. 2011; 18 (6): 1095–102.
10. Trufanov GE, Rud SD, Zheleznyak SE. MRT v diagnostike ishemicheskoy bolezni serdca: uchebnoe posobie. SPb.: ELBI-SPb; 2012. 63 s.
11. Kokov A. N., Masenko V. L., Semenov S. E., Barbarash O. L. MRT serdca v ocenke postinfarktnykh izmenenij i ee rol' v opredelenii taktiki revaskulizacii miokarda. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevanij*. 2014; (3): 97–102.
12. Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2010; (121): 692–705.
13. West AM, Kramer CM. Cardiovascular magnetic resonance imaging of myocardial infarction, viability and cardiomyopathies. *Curr Probl Cardiol*. 2010; (35): 176–220.
14. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2014; (35): 2541–619.
15. Kramer CM, Schulz-Menger J, Bluemke DA. et al. Standardized cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR) protocols, society for cardiovascular magnetic resonance: board of trustee's task force on standardized protocols. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013; 15 (1): 35.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЗДАНИЯ ДЕЛЕЦИИ CCR5DELTA32 МЕТОДОМ CRISPR-CAS9 В ЭМБРИОНАХ ЧЕЛОВЕКА

Т. А. Кодылева¹, А. О. Кириллова¹, Е. А. Тыщик¹, В. В. Макаров², А. В. Хромов², В. А. Гушчин², А. Н. Абубакиров¹, Д. В. Ребриков^{1,3✉}, Г. Т. Сухих¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Изменение гена CCR5 путем редактирования генома CD4⁺-Т-клеток является одним из способов предотвращения распространения ВИЧ-1-инфекции. Однако похожая стратегия защиты от ВИЧ может быть использована и для защиты плода ВИЧ-инфицированных женщин со слабым ответом на антиретровирусную терапию. Создание «естественного» аллеля CCR5delta32 на стадии зиготы может защитить плод от ВИЧ-инфекции во время внутриутробного развития и родов. Целью данного исследования была оптимизация системы CRISPR-Cas9 под создание гомозиготной 32-нуклеотидной делеции (аналогичной природному варианту CCR5delta32) в S-фазе зиготы человека. Для редактирования генома были использованы зиготы с аномальным числом пронуклеусов (более двух), непригодные для ЭКО. 16 аномальных зигот от доноров с WT CCR5 были инъецированы разработанной системой CRISPR-Cas9 в S-фазе. После инъекции зиготы помещали в культуральную среду Blastocyst (COOK) и культивировали в течение 5 дней в CO₂-инкубаторе до стадии бластоцисты (приблизительно 250 клеток). Для анализа эффективности редактирования генома 8 успешно развивавшихся эмбрионов были генотипированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из 16 зигот, инъецированных системой CRISPR-Cas9, лишь 8 достигли стадии бластоцисты. ПЦР-генотипирование показало отсутствие исходного варианта WT CCR5 в 5 из 8 бластоцист (100% гомозиготы по CCR5delta32). Два эмбриона продемонстрировали около 3% и один — около 20% мозаицизма по WT CCR5. Таким образом, эффективность разработанной CRISPR-Cas9 системы для создания аллеля CCR5delta32 в эмбрионах человека довольно высока: более половины эмбрионов оказываются полностью модифицированными.

Ключевые слова: CRISPR-Cas9, редактирование генома, эмбрион человека, CCR5, CCR5delta32, устойчивость к ВИЧ

✉ Для корреспонденции: Денис Владимирович Ребриков
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 26.09.2018 Статья принята к печати: 09.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.052

THE EFFICACY OF CRISPR-CAS9-MEDIATED INDUCTION OF THE CCR5DELTA32 MUTATION IN THE HUMAN EMBRYO

Kodyleva TA¹, Kirillova AO¹, Tyschik EA¹, Makarov VV², Khromov AV², Gushchin VA², Abubakirov AN¹, Rebrikov DV^{1,3✉}, Sukhikh GT¹

¹Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

²Lomonosov Moscow State University, Moscow

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

The editing of the CCR5 gene in the CD4⁺ T cell genome is an effective way of preventing HIV-1 proliferation. Very similar strategies can be used to protect the fetus of an HIV-infected female showing a weak response to antiretroviral therapy. Inducing the “natural” CCR5delta32 mutation in a zygote may guard the fetus against HIV infection both in utero and at birth. In this study, we optimize the CRISPR-Cas9 system to induce a homozygous 32-nt deletion similar to the naturally occurring CCR5delta32 allele in the human zygote at the S-phase. Edits were done in the abnormal tripronuclear zygotes unsuitable for IVF. Sixteen tripronuclear zygotes in the S-phase obtained from WT CCR5 donors were injected with an original CRISPR-Cas9 system designed by the authors. Upon injection, the zygotes were transferred into the Blastocyst (COOK) embryo culture medium and cultured for 5 days in a CO₂ incubator until blastocysts were formed (approximately 250 cells). Eight zygotes that successfully developed into blastocysts were PCR-genotyped to analyze the efficacy of genome editing. Of 16 zygotes injected with CRISPR-Cas9, only 8 reached the blastocyst stage. PCR genotyping revealed the absence of the initial WT CCR5 variant in 5 of 8 blastocysts (100% CCR5delta32 homozygous). Two had about 3% and one about 20% of WT CCR5 mosaicism. This leads us to conclude that the efficacy of the proposed CRISPR-Cas9 system for the induction of the CCR5delta32 mutation in human embryos is very high producing more than 50% of completely modified embryos.

Keywords: CRISPR-Cas9, genome editing, human embryo, CCR5, CCR5delta32, HIV resistance

✉ Correspondence should be addressed: Denis V. Rebrikov
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; drebrikov@gmail.com

Received: 26.09.2018 Accepted: 09.10.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.052

Быстрое развитие CRISPR-технологий в последние годы значительно расширило сферу их применения и способствовало продвижению в клиническую практику. Редактирование генома CD4⁺-Т-клеток путем нокаута или

модификации гена хемокинового рецептора 5 (CCR5) дало обнадеживающие результаты в лечении ВИЧ-1-инфекции [1–5].

Однако кроме изменения гена CCR5 в Т-клетках (с целью блокирования развития СПИДа у ВИЧ-инфицированных

пациентов), создание CCR5delta32-аллеля может быть использовано как элемент технологии оплодотворения *in vitro* (IVF) для защиты плода ВИЧ-инфицированных женщин со слабым ответом на антиретровирусную терапию [6, 7].

Введение системы CRISPR-Cas9 на стадии зиготы позволяет модифицировать геном практически во всех клетках организма и это уже продемонстрировано для нескольких наследственных заболеваний [8–12]. Важно отметить, что измененный геном будет передаваться и последующим поколениям.

Модификация, идентичная природному аллелю CCR5delta32, потенциально защитит плод от ВИЧ-инфекции во время внутриутробного развития, а также во время родов. Дополнительным положительным эффектом может стать пожизненная устойчивость человека к ВИЧ-инфекции.

В этом исследовании мы оптимизировали систему CRISPR-Cas9 с целью создания гомозиготной 32-нуклеотидной делеции (аналогичной природному аллелю CCR5delta32) в S-фазе зиготы человека. Для редактирования генома были использованы зиготы с аномальным числом пронуклеусов, непригодные для программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Одобрение этическим комитетом и согласие пациентов

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (Москва) (протокол №2017/45). Все этапы исследования (методы)

проводились в полном соответствии с существующими международными принципами и правилами работы с эмбрионами. Письменное информированное согласие было получено от каждой семейной пары до момента передачи аномальных зигот для исследования. В исследование были включены семейные пары, в которых для обоих партнеров было показано отсутствие варианта CCR5delta32.

Сбор зигот

Зиготы с аномальным числом пронуклеусов были получены от пациентов, проходящих процедуру ЭКО с сентября 2017 по апрель 2018 годов в НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова. От 11 пар была получена 21 аномальная зигота (16 были инъецированы CRISPR-Cas9 и 5 послужили контролем).

Дизайн, синтез и проверка активности гидовых РНК *in vitro*

Для дизайна гидовых РНК (гРНК) использовали последовательности гена CCR5 дикого типа (WT) и CCR5delta32 из базы данных Национального центра биотехнологической информации (США). Для последующего целевого редактирования и введения желаемой делеции брали участок размером 200 пн, на котором выбирали сайты отжига гРНК с РАМ-сайтом (рис. 1). Было подобрано девять гРНК с посадкой в местах, удобных для последующего гомологичного восстановления двухцепочечных разрывов (табл. 1).

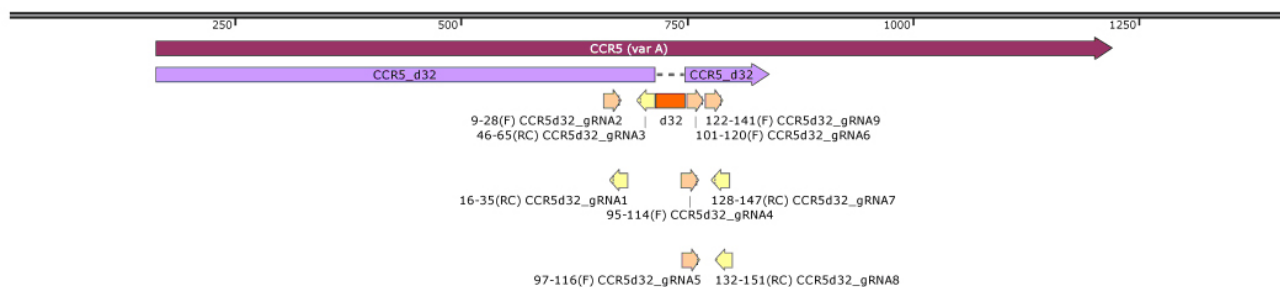


Рис. 1. Расположение гРНК внутри гена CCR5 человека

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов для создания гРНК и ДНК-заплаток

CCR5_BamHI_F	GGATCCTAGGTACCTGGCTGTCGTCCATG
CCR5_XbaI_R	TCTAGATGCAGCAGTGCATCATCC
CCR5d32_gRNA1	TAATACGACTCACTATAGGAAGACCTCTTTTGTAGATCGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA2	TAATACGACTCACTATAGGTTTACCAGATCTCAAAAAGAGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA3	TAATACGACTCACTATAGGGTATGGAAAATGAGAGCTGCGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA4	TAATACGACTCACTATAGGGACATTAAGATAGTCATCTGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA5	TAATACGACTCACTATAGGACATTAAGATAGTCATCTGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA6	TAATACGACTCACTATAGGAAAGATAGTCATCTTGGGCGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA7	TAATACGACTCACTATAGGTGACCATGACAAGCAGCGGCTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA8	TAATACGACTCACTATAGGCAGATGACCATGACAAGCAGGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5d32_gRNA9	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGCCGCTGCTTGTGTCAGTTTGTAGCTAGAAATAGCAAG
CCR5_big_leftpart_F	CAACTCTTGACAGGGCTCTATTTTATAGGC
CCR5_big_leftpart_R	GGACCAGCCCCAAGATGACTATCTTTAATGTATGGAAAATGAGAGCTGCAGGTGTAA
CCR5_big_rightpart_R	GCATAGCTTGGTCCAACCTGTTAG
CCR5_gib_rightpart_F	TTAAAGATAGTCATCTTGGGCTGGTCC
CCR5_small_F	GTGATCACTTGGGTGGTGGC
CCR5_small_R	TTAGGATTCCTCCAGTAGCAGATGAC
CCR5_small_hairpin_R	GCTAAGCGGGTGGGACTTCTAGTCCCACCGCTTAGGATTCCTCCAGTAGCAGATGAC

Матрицу для транскрипционного синтеза гРНК создавали путем попарного отжига праймеров (Евроген; Россия) с последующей достройкой Taq-полимеразой (Евроген; Россия) в ходе ПЦР. Затем проводили синтез гРНК с использованием T7 РНК-полимеразы (Сибэнзим; Россия).

Активность полученных гРНК проверяли с помощью тестовой плазмиды, кодирующей последовательность CCR5 дикого типа. Расщепление ДНК *in vitro* комплексом гРНК и EnGen® Cas9 NLS (New England Biolabs; США) проводили в соответствии со стандартной процедурой, рекомендованной производителем фермента. В качестве наиболее эффективных были выбраны гРНК №1 и №5. Для последующих экспериментов *in vivo* смесь этих гРНК использовали в соотношении 1:1.

Наработка ДНК-заплатки

Для производства ДНК-заплатки использовали метод стандартной ПЦР с перекрытием. После сборки конструкции одноцепочечный фрагмент ДНК (хорошо промотирующий переход от негомولوجичного соединения концов двухцепочечного разрыва (NHEJ) к рекомбинационной репарации) был получен с помощью асимметричной ПЦР с избытком одного из праймеров (с индексом F). Фрагмент имел последовательность: GTGATCACTTGGGTGGTGGCT GTGTTTGCCTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCA AAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCAT ACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCTCGCCGCTGC TTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAA

Формирование РНП-комплекса

Для получения готовых РНП-комплексов и инъекции их в зиготу использовали следующие исходные компоненты: Cas9 (20 мкМ), 1:1 гРНК №1 и №5 (30 нг/мкл), одноцепочечную ДНК (оцДНК) (100 нг/мкл), буфер для разведения (0,25 мМ ЭДТА /10 мМ TrisHCl; pH 7,4).

Для приготовления инъекционного раствора 0,5 мкл Cas9 (20 мкМ) смешивали с 4,5 мкл буфера для разведения. Затем к 5,34 мкл буфера для разведения добавляли 1,56 мкл полученного раствора Cas9 (2 мкМ), 0,6 мкл смеси гРНК (30 нг/мкл) и 2,5 мкл оцДНК (100 нг/мкл). Смесь инкубировали при 37 °С в течение 10 мин, затем сразу использовали для инъекций.

Инъекция комплекса CRISPR-Cas9 в зиготу

Инъекцию CRISPR-Cas9 в аномальные зиготы проводили в S-фазе клеточного цикла в соответствии со стандартным протоколом Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) [13]. Объем инъекции составлял 1 нл. После инъекции CRISPR-Cas9 зиготы дважды промывали средой Sydney IVF Cleavage Medium (COOK Medical LLC; США), затем перемещали в среду Sydney IVF Blastocyst Medium (COOK Medical LLC; США) и инкубировали в CO₂-инкубаторе Эмбриоплан (Вэсттрейд; Россия) со стандартными параметрами в течение 5 дней до образования бластоцисты (около 250 клеток). После инкубации каждую бластоцисту перемещали в 12 мкл буфера для разведения и сразу анализировали с помощью ПЦР.

ПЦР-генотипирование и анализ данных

ПЦР-генотипирование проводили так же, как описано в [14], на приборе DTPRIME Real-Time (ДНК-Технология;

Россия), однако для выхода из зоны взаимодействия гРНК использовали другой универсальный праймер CCR5_check2_R: TCATTTTCGACACCGAAGCAGA. Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения DTPRIME v.7.7 (ДНК-Технология; Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 16 зигот, инъецированных системой CRISPR-Cas9, лишь 8 достигли стадии бластоцисты. Из 5 контрольных зигот (инъецированных буфером для разбавления) 3 достигли бластоцисты. Это стандартная эффективность

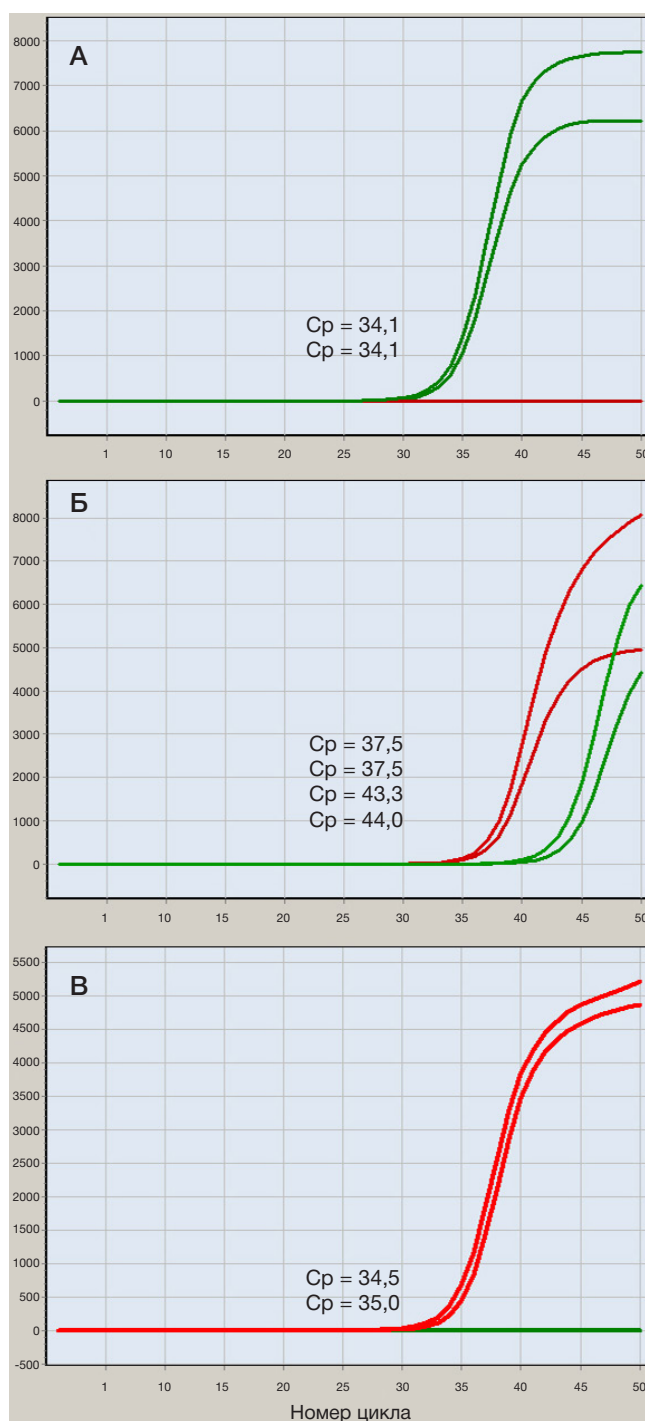


Рис. 2. Кривые ПЦР «в реальном времени», полученные для разных генотипов: двух контрольных эмбрионов (А), двух мозаичных эмбрионов с примерно 3% WT CCR5 (Б), двух эмбрионов, гомозиготных по CCR5delta32 (В)

Таблица 2. Значения пороговых циклов ПЦР для каждого эмбриона

№ эмбриона	Cp WT	Cp del
Контроль 1	34,1	–
Контроль 2	34,1	–
Контроль 3	36,0	–
Эксп. 1	–	38,1
Эксп. 2	40,8	38,1
Эксп. 3	–	37,8
Эксп. 4	44,0	37,5
Эксп. 5	–	37,3
Эксп. 6	43,3	37,5
Эксп. 7	–	34,5
Эксп. 8	–	35,0

Примечание: – отсутствие амплификации.

выхода бластоцист для аномальных зигот, и можно сделать вывод, что процедура инъекции не повысила вероятность остановки развития. ПЦР-генотипирование показало отсутствие исходного варианта WT CCR5 в 5 из 8 бластоцист (с образованием эмбрионов, полностью гомозиготных по CCR5delta32). Два эмбриона продемонстрировали около 3% и один – около 20% остаточного мозаицизма по исходному варианту WT CCR5 (рис. 2). Значения пороговых циклов Cp для каждого эмбриона указаны в табл. 2. Каждый ПЦР-протокол включал в себя отрицательный контрольный образец (буфер для разбавления) в двух повторностях. Все отрицательные контрольные образцы дали отрицательный результат.

ОБСУЖДЕНИЕ

CRISPR-Cas9-опосредованное редактирование генома зигот человека представляет собой эффективный метод модификации внутриклеточной ДНК, достигающий почти

100%-й элиминации исходной последовательности более чем у половины взятых в исследование эмбрионов [9, 10, 12, 15]. Наши результаты хорошо коррелируют с другими случаями применения систем редактирования генома демонстрируя сопоставимо высокую эффективность.

В течение последних двух лет мы видим чрезвычайно быстрое развитие и обновление GE-систем. Однако главным вопросом на сегодняшний день является степень нецелевой активности систем редактирования генома. Только после однозначного подтверждения безопасности такие методы могут быть применены в реальной клинической практике.

ВЫВОДЫ

В работе продемонстрирована эффективность CRISPR-Cas9-опосредованного создания делеции CCR5delta32 в эмбрионах человека. Разработанная система позволила получить более половины полностью модифицированных эмбрионов.

Литература

1. Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR-Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther.* 2018 Jan; 29 (1): 51–67. DOI: 10.1089/hum.2017.032.
2. Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, et al. CRISPR-Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther.* 2017 Aug 2; 25 (8): 1782–9. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.04.027.
3. Haworth KG, Peterson CW, Kiem HP. CCR5-edited gene therapies for HIV cure: Closing the door to viral entry. *Cytherapy.* 2017 Nov; 19 (11): 1325–38. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.05.013.
4. Liu Z, Chen S, Jin X, Wang Q, Yang K, Li C, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* 2017 Sep 9; (7): 47. DOI: 10.1186/s13578-017-0174-2.
5. Nerys-Junior A, Braga-Dias LP, Pezzuto P, Cotta-de-Almeida V, Tanuri A. Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR-Cas9 when targeting the human CCR5 gene. *Genet Mol Biol.* 2018 Jan-Mar; 41 (1): 167–79. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0065.
6. Makokha EP, Songok EM, Orago AA, Koech DK, Chemtai AK, Kobayashi N, et al. Maternal immune responses and risk of infant infection with HIV-1 after a short course Zidovudine in a cohort of HIV-1 infected pregnant women in rural Kenya. *East Afr Med J.* 2002 Nov; 79 (11): 567–73.
7. French CE, Tookey PA, Cortina-Borja M, de Ruiter A, Townsend CL, Thorne C. Influence of short-course antenatal antiretroviral therapy on viral load and mother-to-child transmission in subsequent pregnancies among HIV-infected women. *Antivir Ther.* 2013; 18 (2): 183–92. DOI: 10.3851/IMP2327.
8. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
9. Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics.* 2017 Jun; 292 (3): 525–33. DOI: 10.1007/s00438-017-1299-z.
10. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017 Aug 24; 548 (7668): 413–19. DOI: 10.1038/nature23305.
11. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* 2017 Oct 5; 550 (7674): 67–73. DOI: 10.1038/nature24033.
12. Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell.* 2017 Nov; 8 (11): 811–22. DOI: 10.1007/s13238-017-0475-6.
13. Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection

- procedure. *Hum Reprod.* 1998 Apr; 13 Suppl 1: 76–86.
14. Kofiadi IA, Rebrikov DV, Trofimov DY, Alexeev LP, Khaitov RM. Allelic distribution of the CCR5, CCR2, and SDF1 gene polymorphisms associated with HIV-1/AIDS resistance in Russian populations. *Dokl Biol Sci.* 2007 Jul-Aug; (415): 320–3.
 15. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet.* 2016 May; 33 (5): 581–588. DOI: 10.1007/s10815-016-0710-8.
- ## References
1. Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR-Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther.* 2018 Jan; 29 (1): 51–67. DOI: 10.1089/hum.2017.032.
 2. Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, et al. CRISPR-Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther.* 2017 Aug 2; 25 (8): 1782–9. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.04.027.
 3. Haworth KG, Peterson CW, Kiem HP. CCR5-edited gene therapies for HIV cure: Closing the door to viral entry. *Cytherapy.* 2017 Nov; 19 (11): 1325–38. DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.05.013.
 4. Liu Z, Chen S, Jin X, Wang Q, Yang K, Li C, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* 2017 Sep 9; (7): 47. DOI: 10.1186/s13578-017-0174-2.
 5. Nerys-Junior A, Braga-Dias LP, Pezzuto P, Cotta-de-Almeida V, Tanuri A. Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR-Cas9 when targeting the human CCR5 gene. *Genet Mol Biol.* 2018 Jan-Mar; 41 (1): 167–79. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0065.
 6. Makokha EP, Songok EM, Orago AA, Koech DK, Chemtai AK, Kobayashi N, et al. Maternal immune responses and risk of infant infection with HIV-1 after a short course Zidovudine in a cohort of HIV-1 infected pregnant women in rural Kenya. *East Afr Med J.* 2002 Nov; 79 (11): 567–73.
 7. French CE, Tookey PA, Cortina-Borja M, de Ruiter A, Townsend CL, Thorne C. Influence of short-course antenatal antiretroviral therapy on viral load and mother-to-child transmission in subsequent pregnancies among HIV-infected women. *Antivir Ther.* 2013; 18 (2): 183–92. DOI: 10.3851/IMP2327.
 8. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
 9. Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics.* 2017 Jun; 292 (3): 525–33. DOI: 10.1007/s00438-017-1299-z.
 10. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017 Aug 24; 548 (7668): 413–19. DOI: 10.1038/nature23305.
 11. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* 2017 Oct 5; 550 (7674): 67–73. DOI: 10.1038/nature24033.
 12. Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell.* 2017 Nov; 8 (11): 811–22. DOI: 10.1007/s13238-017-0475-6.
 13. Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod.* 1998 Apr; 13 Suppl 1: 76–86.
 14. Kofiadi IA, Rebrikov DV, Trofimov DY, Alexeev LP, Khaitov RM. Allelic distribution of the CCR5, CCR2, and SDF1 gene polymorphisms associated with HIV-1/AIDS resistance in Russian populations. *Dokl Biol Sci.* 2007 Jul-Aug; (415): 320–3.
 15. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet.* 2016 May; 33 (5): 581–588. DOI: 10.1007/s10815-016-0710-8.

УРОВЕНЬ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И АКТИВНОСТЬ ДНКАЗЫ I ПРИ НОРМАЛЬНОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

К. Г. Аветисова¹✉, С. В. Костюк², Э. В. Костюк², Е. С. Ершова², Г. В. Шмарина², Н. Н. Вейко², Д. С. Спиридонов¹, П. А. Клименко¹, М. А. Курцер¹

¹Кафедра акушерства и гинекологии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

²Лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр, Москва

При патологии плаценты происходит активация апоптотических процессов в трофобласте, что сопровождается повышением в кровотоке матери концентрации микровезикул, содержащих плацентарную ДНК (или ДНК плода). Фрагменты ДНК плода стимулируют выброс нейтрофилами участков ядерной и/или митохондриальной ДНК. Таким образом, при осложненной беременности следует ожидать значительного увеличения общей концентрации внутриклеточной ДНК (вкДНК) в плазме матери. Целью работы было исследование совместных изменений концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока — фермента ДНКазы I в плазме небеременных и беременных женщин. В исследовании принимали участие 40 здоровых небеременных женщин, 40 беременных женщин с нормально протекающей беременностью и 35 пациенток с внутриутробной задержкой роста плода (ВЗРП). Мы не обнаружили повышения уровня суммарной вкДНК у пациенток с осложненной беременностью. Более того, концентрация вкДНК в плазме пациенток была даже ниже (статистически незначимо), чем соответствующие показатели в плазме здоровых беременных и небеременных женщин. Так, значение медианы концентрации вкДНК в группе здоровых небеременных женщин составило 75,5 нг/мл, в группе здоровых беременных женщин этот показатель достигал 78,0 нг/мл, у пациенток с ВЗРП он был равен 42,1 нг/мл. В то же время мы обнаружили достоверное повышение активности ДНКазы I в плазме женщин с ВЗРП. Медиана активности ДНКазы I в группах здоровых беременных и небеременных женщин составила соответственно 3,0 и 3,4 IU/мл. У пациенток с ВЗРП различной степени тяжести этот показатель достигал 6,3 IU/мл ($p < 0,001$). Повышенная активность ДНКазы I в плазме женщин с патологией беременности косвенно свидетельствует о транзитном повышении у них уровня циркулирующей вкДНК. Полученные результаты показывают, что высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затрудняет и искажает результаты анализа концентрации вкДНК при беременности, особенно при патологии. Однако если учитывать три показателя — концентрацию вкДНК, активность ДНКазы I и отношение вкДНК/ДНКазы I, то в перспективе можно разработать систему мониторинга уровня гибели клеток в организме матери на протяжении всего периода беременности.

Ключевые слова: вкДНК, ДНКазы I, беременность, преэклампсия, ВЗРП

✉ **Для корреспонденции:** Кристина Григорьевна Аветисова
Севастопольский проспект, д. 24а, г. Москва, 117209; c.avetisova2016@yandex.ru

Статья получена: 15.03.18 **Статья принята к печати:** 27.06.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.041

LEVELS OF CELL-FREE DNA AND DNASE I ACTIVITY IN COMPLICATED AND NORMAL PREGNANCIES

Avetisova KG¹✉, Kostyuk SV², Kostyuk EV², Ershova ES², Shmarina GV², Veiko NN², Spiridonov DS¹, Klimenko PA¹, Kurtser MA¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

²Laboratory of Molecular Biology, Research Centre for Medical Genetics, Moscow

Placental pathology is accompanied by the activation of apoptosis in the trophoblast and the subsequent increase in the concentrations of microvesicles containing placental (or fetal) DNA accumulating in the maternal blood. Fragments of fetal DNA stimulate the release of nuclear and/or mitochondrial DNA fragments by neutrophils. Therefore, one can expect that complicated pregnancies will be characterized by the dramatic elevation of total cell-free DNA (cfDNA) levels in maternal plasma. The aim of this work was to study the dynamics of plasma cfDNA concentrations and the activity of DNase I, an enzyme involved in the elimination of cfDNA from the bloodstream, in nonpregnant and pregnant women. Our study recruited 40 healthy nonpregnant women, 40 women with uncomplicated pregnancies and 35 women with the intrauterine growth restriction (IUGR) of the fetus. We did not observe the elevation of the total cfDNA concentrations in the patients with complicated pregnancies. Moreover, cfDNA concentrations in their plasma were even lower (though this difference was statistically insignificant) than in healthy pregnant and nonpregnant women. The median values of cfDNA concentrations in the group of healthy nonpregnant women were 75.5 ng/ml; in the group of healthy pregnant women, 78.0 ng/ml; and in the patients with IUGR, 42.1 ng/ml. At the same time, we observed a significant increase in DNase I activity in the plasma of women with IUGR. The median DNase I activity in the groups of healthy pregnant and nonpregnant women was 3.0 and 3.4 IU/ml, respectively. In patients with different grades IUGR of the fetus this parameter was as high as 6.3 IU/ml ($p < 0.001$). Increased DNase I activity in the plasma of women with complicated pregnancies indirectly suggests a transient elevation of circulating cfDNA levels. Our study shows that the high level of activity exhibited by the cfDNA elimination system impedes the analysis of cfDNA concentrations in complicated pregnancies and skews its results. However, if cfDNA, DNase I activity and the cfDNA/DNase I ratio were all taken into account, it could be possible to develop a tool for the monitoring of cell death in the mother throughout the entire pregnancy.

Keywords: cfDNA, DNase I, pregnancy, preeclampsia, IUGR

✉ **Correspondence should be addressed:** Kristina G. Avetisova
Sevastopolsky prospect, 24a, Moscow, 117209; c.avetisova2016@yandex.ru

Received: 15.03.18 **Accepted:** 27.06.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.041

Присутствие ДНК в плазме и сыворотке крови было обнаружено в 1948 г. еще до открытия структурной формулы этой молекулы [1]. ДНК, присутствующая в крови в составе плазмы (сыворотки), получила название циркулирующей или внеклеточной ДНК (вкДНК) [2]. В 1997 г. впервые было показано наличие циркулирующей вкДНК эмбриона в плазме крови беременной женщины [3]. Обнаружение эмбриональной вкДНК в материнской плазме и сыворотке привело к созданию нетравматичных методов пренатальной диагностики, направленных на обнаружение генетической патологии эмбриона [4]. В настоящее время разработаны методы, позволяющие провести полногеномный анализ ДНК плода в составе вкДНК плазмы матери [5].

Помимо анализа генетических аномалий плода, анализ вкДНК позволяет проводить мониторинг связанных с беременностью осложнений, таких как преэклампсия и невынашивание беременности [6–8]. В этом случае определяют не конкретный мутантный ген, а общую концентрацию вкДНК материнской крови или отдельно вкДНК плода. Основным источником вкДНК плода в крови матери считают гибнущие в результате некроза и/или апоптоза клетки плаценты [9].

Необходимо отметить, что при измерении концентрации вкДНК в плазме крови беременных женщин исследователи не учитывают процессы, направленные на снижение концентрации вкДНК в кровотоке. Увеличение количества вкДНК в крови вследствие роста в организме уровня гибели клеток приводит к активации компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока и последующему снижению концентрации вкДНК. Эффект значительного снижения концентрации вкДНК на фоне хронических процессов, сопровождающихся усиленной гибелью клеток организма, мы наблюдали ранее у пациентов с хронической сердечно-сосудистой патологией [10] и лиц, длительное время работающих в условиях повышенного радиационного фона [11].

Ранее нами были исследованы совместные изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока — фермента ДНКазы I в плазме крови небеременных женщин и женщин с нормальной и осложненной беременностью [12]. Поскольку в этой работе были получены нестандартные результаты: 1) уровень вкДНК у женщин с нормальной и патологической беременностью не превышал соответствующий показатель в группе контроля (согласно современным литературным данным при нормальной и патологической беременности он резко повышается [13]); 2) обнаружено двукратное повышение эндонуклеазной активности у женщин с патологией беременности (этот феномен был описан впервые), было решено провести повторное исследование, в котором повышенное внимание уделялось бы клиническим параметрам здоровых и беременных женщин.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 115 женщин в возрасте 22–40 лет (средний возраст 32 ± 4 года), проживающие в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. В зависимости от групп, критерии включения варьировались: в группу 1 вошли практически здоровые небеременные женщины ($n = 40$), представленные студентками и ординаторами медицинского учреждения (волонтеры); группа 2 — женщины с нормально протекающей

беременностью (срок гестации более 37 недель; $n = 40$) без какой-либо выявленной патологии, родившие здоровых детей без признаков гипоксии и гипотрофии; группа 3 — женщины с проблемной беременностью, с клиническими диагнозами невынашивания, плацентарной недостаточности, внутриутробной задержки роста плода (ВЗРП), хронической гипоксии плода, наличием несостоятельного рубца на матке (срок гестации более 30 недель, $n = 35$). Критерии исключения не применялись. Забор крови у здоровых небеременных женщин осуществляли между 10 и 15 днем менструального цикла. Запланированное в рамках кандидатской диссертации исследование было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова (протокол № 159 от 21.11.2016). Всеми участниками исследования было подписано добровольное информированное согласие.

Диагностика развития плода

Динамику роста плода во время беременности определяли с помощью ультразвуковой антропометрии: измеряли бипариетальный размер головки, диаметры груди и живота и длину бедренной кости. При отставании этих размеров от указанных в литературе среднепопуляционных значений [14] на 2 недели ставили диагноз ВЗРП I степени, при отставании на 2–4 недели — ВЗРП II степени и более 4 недель — ВЗРП III степени. Окончательный диагноз ВЗРП устанавливали после родов на основании данных массы плода. Нормативные параметры находились между 75 и 25 перцентильными кривыми, I степень ВЗРП соответствовала 25–10 кривой. II степень — 10–3 кривой, III степень — ниже 3 кривой [15]. Использовали также массо-ростовой коэффициент новорожденных: норма — выше 60, ВЗРП I степени — 55–60, II степени — 50–55, III степени — ниже 50. Функциональное состояние плода во время беременности и родов оценивали с помощью методов функциональной диагностики: кардиотокографии (КТГ) и доплерометрии сосудов матки, пуповины и плода. Ультразвуковые исследования (УЗИ) проводили на аппарате Voluson 530 MT (Kretztechnik; Австрия), Voluson E8 (General Electric; США) с использованием датчиков RIC 5–9 D (4–9 МГц), C1–5D (2–5 МГц), RAB 4–8 D (2–8 МГц); КТГ — с помощью фетального монитора (GE Corometrics (250CX); США).

Специальные исследования

Выделение фрагментов циркулирующей вкДНК из 1 мл гепаринизированной плазмы крови проводили методом фенольной экстракции. Клетки крови осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин, полученную плазму смешивали с 10% лаурилсаркозилатом натрия, 0,2 М EDTA и стандартным раствором РНКазы с концентрацией 0,075 мг/мл (Sigma; USA), затем инкубировали в течение 45 мин и обрабатывали стандартным раствором протеинкиназы К 0,2 мг/мл (Promega; USA) в течение 24 ч при 37 °C. После двух циклов отмывания с насыщенным фенольным раствором фрагменты ДНК осаждали добавлением двух объемов этанола в присутствии 2 М ацетата аммония. Затем осадок дважды отмывали добавлением 75% этанола, высушивали и растворяли в воде. Для определения концентрации вкДНК применяли флуоресцирующий краситель Pico

Green (Sigma; США). Флуоресценцию регистрировали на приборе LS-55 (Perkin Elmer; США).

Активность ДНКазы 1 определяли по ранее разработанной методике [16]. Субстрат для ДНКазы 1 (Синтол; Россия) представляет собой двухцепочечный олигодезоксирибонуклеотид длиной 30 звеньев состава R6G – ACC CCC AGC GAT TAT CCA AGC GGG – BHQ1. Последовательность модельного субстрата не имеет особого значения. На 5'-конце олигонуклеотид содержит флуоресцентную группу (5(6)-карбоксиродамин), на 3'-конце — тушитель флуоресценции (BHQ1). При эндонуклеазном гидролизе наблюдается увеличение флуоресценции красителя. 10 мкл образца плазмы крови добавляли к 90 мкл раствора для ДНКазы 1 (10 мМ HEPES, pH 7,5, 20 мМ MgCl₂, 5 мМ CaCl₂), который содержал 3 пикоМ олигонуклеотида-субстрата. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 ч, регистрировали изменение сигнала флуоресценции красителя с помощью планшетного ридера (EnSpire; Финляндия). Для расчета активности ДНКазы 1 получали калибровочную прямую, которая связывает величину разгорания флуоресценции красителя с концентрацией стандартного образца ДНКазы 1 (Сигма; США) в растворе. Единица активности: 1 ед., равная 1 нг/мл, соответствует активности ДНКазы 1 (увеличение флуоресценции субстрата), взятой в концентрации 1 нг/мл (1 ч, 37 °С). Проводили не менее трех параллельных измерений для одного образца. Относительная стандартная ошибка метода — 5%.

Статистическую обработку результатов проводили с применением критерия Манна–Уитни, с помощью программы «StatPlus 2007» (Statistical Graphics Corp.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что во 2-й группе наблюдений (женщины с нормально протекающей беременностью) сердечная деятельность плода по шкале Фишера оценивалась от 7 до 10 баллов, объемный кровоток в аорте составлял от 180 до 260 мл/мин, в вене пуповины от 86 до 140 мл/мин на 1 кг массы плода. В 3-й группе в 28 из 35 наблюдений было зарегистрировано снижение функционального состояния плода по шкале

Фишера до 4–7 баллов, объемный кровоток в аорте плода достигал 120–174 мл/мин, в вене пуповины 60–86 мл/мин на 1 кг. Характеристика пациенток с ВЗРП I–III степени тяжести представлена в табл. 1. Наиболее значительные изменения функционального состояния плода были зарегистрированы у пациенток при гипотрофии II и III степени. Нарушение кровотока у пациенток с ВЗРП II степени характеризовалось нарушениями маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока. При ВЗРП III степени регистрировались нарушения плодово-плацентарного кровотока: нулевой или реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока. У пациенток с ВЗРП II и III степени были зарегистрированы снижение функционального состояния плода (ниже 7 баллов по шкале Фишера), нулевой или реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока.

Концентрация вкДНК у здоровых небеременных женщин (табл. 2) варьировала в пределах 11–123 нг/мл (медиана 75,5 нг/мл), при нормальной беременности — в пределах 2–347 нг/мл (медиана 78 нг/мл) и в случае беременности с ВЗРП — в пределах 1,2–595,7 нг/мл (медиана 42,1 нг/мл). Согласно критерию Манна–Уитни группы не различаются достоверно между собой ($p > 0,05$). Можно отметить, что во 2-й и в 3-й группах у 9 образцов (22,5%) концентрации вкДНК превышали верхнюю границу для небеременных женщин (123 нг/мл). Обращает на себя внимание факт значительного разброса данных у беременных по сравнению с небеременными женщинами. Так, коэффициенты вариации изменялись в ряду: 0,42 (группа 1); 0,87 (группа 2); 1,37 (группа 3).

Основной причиной снижения концентрации вкДНК может быть повышение активности компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из факторов, влияющих на элиминацию вкДНК, является активность в плазме крови ДНКазы I, отвечающей за гидролиз вкДНК. У небеременных женщин активность этого фермента в плазме крови (табл. 2) варьировала в пределах 1,1–5,9 IU/мл (медиана 3 IU/мл), при нормальной беременности — в пределах 0,6–14,8 IU/мл (медиана 3,4 IU/мл) и в случае беременности с ВЗРП — в пределах 3,9–14,3 IU/мл

Таблица 1. Характеристика пациенток с ВЗРП

	Пациентки с ВЗРП I степени $n = 11$	Пациентки с ВЗРП II степени $n = 13$		Пациентки с ВЗРП III степени $n = 11$		
			p_1		p_1	p_2
Кровоток в аорте	220 (154; 254)	150 (126; 180)	0,0002	122 (120; 142)	0,0001	0,0005
Кровоток в пуповинной вене	110 (82; 120)	80 (64; 86)	0,0001	64 (60; 68)	0,0001	0,0002
Реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте	–	1 (7,7%)	1	6 (54,5%)	0,0124	0,0233
Преждевременные роды	–	3 (23,1%)	0,2228	4 (36,3%)	0,0902	0,6591
Состояние преэклампсии	–	3 (23,1%)	0,2228	7 (63,6%)	0,0039	0,0953
Баллы по шкале Фишера	8 (7; 9)	6,5 (6; 7)	0,0001	5 (4,5; 6)	0,0001	0,0002
Срок беременности (недели)	40 (38; 41)	38 (36; 41)	0,0397	37 (30; 40)	0,0008	0,0084
Вес плода (г)	2790 (2630; 3030)	2520 (2350; 2650)	0,0001	1720 (600; 2270)	0,0001	< 0,0001
Рост плода (см)	48 (47; 51)	47 (46; 50)	0,0221	43 (29; 47)	0,0002	0,001

Примечание: результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); p_1 — значения p при сравнении с группой беременных женщин с ВЗРП I степени; p_2 — значения p при сравнении с группой беременных женщин с ВЗРП II степени.

(медиана 6,3 IU/мл). Согласно критерию Манна–Уитни группы 1 и 2 не различаются достоверно между собой ($p > 0,05$). Однако группа пациенток с осложненной беременностью статистически значимо отличается от группы здоровых небеременных женщин ($p < 10^{-7}$) и группы женщин с нормально протекающей беременностью ($p < 10^{-5}$) по показателю активности ДНКазы I в плазме. Таким образом, плазма крови беременных с диагностированной ВЗРП характеризуется высокими значениями активности ДНКазы I, по сравнению с соответствующими показателями у женщин с нормально протекающей беременностью и у небеременных женщин. У 18 из 35 (51,4%) беременных женщин из группы 3 были отмечены высокие значения активности ДНКазы I, которые не встречались в группе небеременных здоровых женщин. В группе 2 повышенные значения активности ДНКазы I обнаружены только у 4 из 40 (10%) беременных ($p = 0,0002$, согласно критерию Фишера).

В табл. 3 представлены результаты исследования корреляционной зависимости между концентрацией вкДНК и уровнем активности ДНКазы I. В группе здоровых небеременных женщин была выявлена умеренно выраженная, но статистически значимая отрицательная корреляционная связь между этими показателями ($R = 0,37$; $p < 0,05$). У беременных женщин (особенно с осложненной беременностью) концентрация вкДНК и уровень активности ДНКазы I слабо коррелировали между собой.

При сравнении показателей пациенток с ВЗРП различной степени тяжести статистически значимых различий между подгруппами обнаружено не было. Однако концентрация вкДНК и интегративный показатель вкДНК/

ДНКазы I обнаруживали стойкую тенденцию к повышению в соответствии со степенью тяжести ВЗРП (табл. 4). Анализ индивидуальных параметров показал, что только у 4 из 24 (16,7%) пациенток с ВЗРП I и II степени тяжести были отмечены высокие значения концентрации вкДНК, не встречавшиеся в группе небеременных здоровых женщин, в то время как в группе женщин с ВЗРП III степени тяжести таких пациенток было 6 из 11 (54,5%; $p = 0,0413$, согласно критерию Фишера). Более того, при сопоставлении интегративного показателя вкДНК/ДНКазы I у пациенток с различной степенью ВЗРП с соответствующими параметрами в группах контроля статистически значимые различия были обнаружены только для пациенток с ВЗРП I–II степени тяжести (в обоих случаях $p < 0,001$). У пациенток с ВЗРП III степени соотношение вкДНК/ДНКазы I существенно не отличалось от таковых в группах здоровых небеременных и беременных женщин (табл. 2, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уровень материнской вкДНК высоко коррелирует с количеством вкДНК плацентарного происхождения [17]. В настоящее время известно, что только небольшое количество вкДНК матери попадает в кровоток из солидных органов, таких как печень или почки, большая часть вкДНК имеет гематопозитическое происхождение. В частности, стабильным источником низкомолекулярной фрагментированной вкДНК могут быть дифференцирующиеся эритробласты. Быстрый подъем уровня вкДНК в циркуляции при патологических процессах и физической нагрузке происходит в результате активации нейтрофилов,

Таблица 2. Концентрация вкДНК в плазме крови и активность ДНКазы I у здоровых небеременных женщин, а также у женщин с нормальной и осложненной беременностью

	Здоровые небеременные женщины $n = 40$	Здоровые беременные женщины $n = 40$		Беременные женщины с ВЗРП $n = 35$		
	75,5 (11,0; 123,0)	78 (2,0; 347,0)	$p1$	42,1 (1,2; 595,7)	$p1$	$p2$
Концентрация вкДНК (нг/мл)			0,59		0,316	0,258
Активность ДНКазы (IU/мл)	3 (1,1; 5,9)	3,4 (0,6; 14,8)	0,088	6,3 (3,9; 14,3)	$< 0,001$	$< 0,001$
Соотношение вкДНК/ДНКазы I	20,5 (6,5; 101,8)	25,9 (0,3; 112,4)	0,889	8,4 (0,1; 152,7)	$< 0,001$	0,002

Примечание: результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); $p1$ — значения p при сравнении с группой здоровых небеременных женщин; $p2$ — значения p при сравнении с группой здоровых беременных женщин.

Таблица 3. Коэффициент корреляции Спирмена (Spearman Correlation) между концентрацией вкДНК и активностью ДНКазы I

	R	p
Здоровые небеременные женщины	–0,39	$< 0,05$
Здоровые беременные женщины	–0,28	$> 0,05$
Пациентки с осложненной беременностью	–0,18	$> 0,05$

Таблица 4. Концентрация вкДНК и уровень активности ДНКазы I у пациенток с ВЗРП различной степени тяжести

	Пациентки с ВЗРП I степени $n = 11$	Пациентки с ВЗРП II степени $n = 13$		Пациентки с ВЗРП III степени $n = 11$		
	34,7 (8,0; 160,7)	76 (7,8; 251,1)	$p1$	103,5 (1,2; 595,7)	$p1$	$p2$
Концентрация вкДНК (нг/мл)			0,817		0,212	0,354
Активность ДНКазы (IU/мл)	5,7* (4,1; 13,1)	7,5* (3,9; 14,3)	0,183	5,2* (3,9; 10,0)	0,793	0,271
Соотношение вкДНК/ДНКазы I	5,2* (0,6; 28,2)	10,1* (0,8; 36,4)	0,817	18,5 (0,1; 152,7)	0,325	0,271

Примечание: результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); $p1$ — значения p при сравнении с группой пациенток с ВЗРП I степени; $p2$ — значения p при сравнении с группой пациенток с ВЗРП II степени; * — $p < 0,01$ при сравнении с группами здоровых небеременных и беременных женщин.

выбрасывающих в качестве «ловушек» сети ядерной и/или митохондриальной ДНК [18].

вкДНК воздействует на многие клетки организма. Циркулирующая ДНК может усилить окислительный стресс, стимулировать синтез провоспалительных цитокинов и индуцировать асептическое воспаление [19]. Сети вкДНК, выбрасываемые активированными нейтрофилами, привлекают большое количество тромбоцитов и существенно повышают риск тромбообразования [18]. Организм защищается от негативного действия избыточных количеств вкДНК путем активации системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из компонентов системы элиминации вкДНК является эндонуклеазная активность крови. Основная эндонуклеаза крови, ДНКазы I, гидролизуют фосфодиэфирные связи в цепях ДНК. Накопление в цепях одноцепочечных разрывов приводит к возникновению двухцепочечных разрывов и снижению молекулярного веса фрагментов вкДНК. Низкомолекулярные фрагменты вкДНК могут элиминироваться путем почечной фильтрации. У здоровых небеременных женщин мы обнаружили умеренно выраженную, но статистически значимую отрицательную корреляцию между количеством вкДНК в плазме и активностью ДНКазы I. По-видимому, активность этого фермента в данном случае служит основным фактором, ответственным за вывод фрагментов вкДНК из кровотока. У женщин с нормально протекающей беременностью и у пациенток с ВЗРП корреляции между уровнем вкДНК и активностью ДНКазы I обнаружено не было.

При патологии плаценты происходит активация апоптотических процессов в трофобласте, что сопровождается повышением в кровотоке матери концентрации микровезикул, содержащих плацентарную вкДНК. Микровезикулы трофобласта, в свою очередь, стимулируют выброс нейтрофилами нитей ядерной и/или митохондриальной ДНК (нетоз). Таким образом, при осложненной беременности следует ожидать значительного увеличения общей концентрации вкДНК в плазме крови матери. В данном исследовании нам не удалось выявить повышения уровня суммарной вкДНК у беременных женщин с ВЗРП. Более того, концентрация вкДНК в плазме пациенток с осложненной беременностью была даже ниже (статистически незначимо), чем соответствующий показатель в плазме здоровых беременных и небеременных женщин. В то же время мы обнаружили достоверное увеличение активности ДНКазы I в плазме беременных женщин с ВЗРП, что косвенно свидетельствует о транзитном повышении уровня циркулирующей вкДНК у пациенток с осложненной беременностью. Можно предположить, что при ВЗРП значительное увеличение общей концентрации вкДНК в плазме матери активирует защитные механизмы (в том числе ДНКазу I), способствующие элиминации избыточных количеств вкДНК из кровотока. У большинства пациенток с ВЗРП I и II степени тяжести умеренные нарушения

плацентарного кровотока (табл. 1) приводят к умеренному и, возможно, транзитному повышению уровня вкДНК, которая быстро выводится из кровотока активированной ДНКазой I. У таких пациенток можно обнаружить низкие концентрации вкДНК, высокоактивную ДНКазу I и низкое значение показателя «вкДНК/активность ДНКазы I». У большинства пациенток с ВЗРП III степени происходит быстрое накопление вкДНК в плазме, с которым не справляются механизмы элиминации. У таких пациенток можно обнаружить повышенные концентрации вкДНК, высокоактивную ДНКазу I и высокий показатель «вкДНК/активность ДНКазы I». При этом избыток вкДНК в циркуляции усугубляет нарушения плацентарного кровотока и повышает риск неблагоприятного исхода беременности.

Полученные результаты показывают, что высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затрудняет и искажает результаты анализа концентрации вкДНК при беременности, особенно при патологии. Видимо поэтому, литературные данные об изменении концентрации вкДНК при патологии беременности столь противоречивы. Однако, если учитывать три показателя — концентрацию вкДНК, активность ДНКазы I и отношение вкДНК/ДНКазы I, то в перспективе можно разработать систему мониторинга уровня гибели клеток в организме беременной на протяжении всей беременности (например, один раз в три месяца). Эти показатели дают информацию об уровне гибели клеток и об эффективности работы системы элиминации, которая включает ДНКазу I и другие значимые при беременности компоненты. Так, если при мониторинге на определенной неделе беременности имеет место усиление активности ДНКазы I на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, то можно говорить о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при повышенной активности ДНКазы I свидетельствуют о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма. При этом данные УЗИ могут зафиксировать ВЗРП гораздо позднее, поскольку требуется некоторое время для накопления признаков ВЗРП, тестируемых ультразвуком.

ВЫВОДЫ

Исследованы совместные изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока — фермента ДНКазы I в плазме крови небеременных женщин, женщин с нормальной беременностью и беременностью, осложненной ВЗРП. Показано, что концентрация вкДНК в плазме матери не является надежным маркером ВЗРП в последнем триместре беременности. Однако одновременное определение концентрации вкДНК и активности ДНКазы I может дать ценную информацию о развитии ВЗРП.

Литература

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Acad Sci Paris 1948; 142: 241–3.
2. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey. Biochimica et biophysica acta. 2007; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
3. Urbanova M, Plzak J, Strnad H, Betka J. Circulating nucleic acids as a new diagnostic tool. Cell Mol Biol Lett. 2010 Jun; 15 (2): 242–59. DOI: 10.2478/s11658-010-0004-6.
4. Lo YM, Chiu RW. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2012; 13: 285–306. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163806.
5. Lo YM. Non-invasive prenatal testing using massively parallel

- sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Biomed Online*. 2013 Dec; 27 (6): 593–8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.08.008.
6. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*. 2006; 26: 831–36. DOI: 10.1002/pd.1513.
 7. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184 (3): 414–9. DOI: 10.1067/mob.2001.109594.
 8. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011 Feb; 32 Suppl: 17–20. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.018.
 9. Al Nakib M, Desbrière R, Bonello N, Bretelle F, Boublil L, Gabert J, et al. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2009; 26 (1): 24–8. DOI: 10.1159/000236355.
 10. Вейко Н. Н., Булычева Н. В., Рогинко О. А., Вейко Р. В., Ершова Е. С., Коздoba О. А. и др. Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной днк — маркер гибели клеток организма. *Биомедицинская химия*. 2008; 54 (1): 78–93.
 11. Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS, Osipov AN, Zhuravleva VF, Pankratova GV, et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res*. 2015 Sep; 779: 1–15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004.
 12. Ershova E, Sergeeva V, Klimenko M, Avetisova K, Klimenko P, Kostyuk E, Veiko N, Veiko R, Izevskaya V, Kutsev S, Kostyuk S. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy. *Biomed Rep*. 2017 Oct; 7 (4): 319–24. DOI: 10.3892/br.2017.968.
 13. Sur Chowdhury C, Hahn S, Hasler P, Hoesli I, Lapaire O, Giaglis S. Elevated Levels of Total Cell-Free DNA in Maternal Serum Samples Arise from the Generation of Neutrophil Extracellular Traps. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 40 (4): 263–7. DOI: 10.1159/000444853.
 14. Демидов В. Н., Бычков П. А., Логвиненко А. В., Воеводина С. М. Ультразвуковая биометрия. Справочные таблицы и уравнения. В книге: Медведева М. В., Зыкина Б. И., редакторы. Клинические лекции по УЗ-диагностике в перинатологии. М., 1990; 83–92.
 15. Деметьева Г. М. Оценка физического развития новорожденных: пособие для врачей. М., 2000. 25 с.
 16. Ermakov AV, SV Kostyuk, MS Konkova, NA Egolina, EM Malinovskaya, NN Veiko. Extracellular DNA fragments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1137 (1): 41–6.
 17. Muñoz-Hernández R, Medrano-Campillo P, Miranda ML, Macher HC, Praena-Fernández JM, Vallejo-Vaz AJ, et al. Total and Fetal Circulating Cell-Free DNA, Angiogenic, and Antiangiogenic Factors in Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Am J Hypertens*. 2017 Jul 1; 30 (7): 673–82. DOI: 10.1093/ajh/hpx024.
 18. Hahn S, Giaglis S, Buser A, Hoesli I, Lapaire O, Hasler P. Cell-free nucleic acids in (maternal) blood: any relevance to (reproductive) immunologists? *J Reprod Immunol*. 2014 Oct; 104–105: 26–31. DOI: 10.1016/j.jri.2014.03.007.
 19. Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien MÈ, Duval C, Chemtob S, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction*. 2016 Dec; 152 (6): R277–R292. Epub 2016 Sep 27.

References

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241–3.
2. Fleischacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
3. Urbanova M, Plzak J, Strnad H, Betka J. Circulating nucleic acids as a new diagnostic tool. *Cell Mol Biol Lett*. 2010 Jun; 15 (2): 242–59. DOI: 10.2478/s11658-010-0004-6.
4. Lo YM, Chiu RW. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012; 13: 285–306. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163806.
5. Lo YM. Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Biomed Online*. 2013 Dec; 27 (6): 593–8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.08.008.
6. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*. 2006; 26: 831–36. DOI: 10.1002/pd.1513.
7. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184 (3): 414–9. DOI: 10.1067/mob.2001.109594.
8. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011 Feb; 32 Suppl: 17–20. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.018.
9. Al Nakib M, Desbrière R, Bonello N, Bretelle F, Boublil L, Gabert J, et al. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2009; 26 (1): 24–8. DOI: 10.1159/000236355.
10. Vejko NN, Bulychева NV, Roginko OA, Vejko RV, Ershova ES, Kozdoba OA, i dr. Fragmenty transkribiruemoj oblasti rибosomnogo povtora v sostave vneketochnoj dнк — marker gibeli kletok organizma. *Biomedicinskaja himija*. 2008; 54 (1): 78–93.
11. Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS, Osipov AN, Zhuravleva VF, Pankratova GV, et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res*. 2015 Sep; 779: 1–15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004.
12. Ershova E, Sergeeva V, Klimenko M, Avetisova K, Klimenko P, Kostyuk E, Veiko N, Veiko R, Izevskaya V, Kutsev S, Kostyuk S. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy. *Biomed Rep*. 2017 Oct; 7 (4): 319–24. DOI: 10.3892/br.2017.968.
13. Sur Chowdhury C, Hahn S, Hasler P, Hoesli I, Lapaire O, Giaglis S. Elevated Levels of Total Cell-Free DNA in Maternal Serum Samples Arise from the Generation of Neutrophil Extracellular Traps. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 40 (4): 263–7. DOI: 10.1159/000444853.
14. Demidov VN, Bychkov PA, Logvinenko AV, Voevodina SM. Ul'trazvukovaja biometrija. Spravochnye tablicy i uravnenija. V knige: Medvedeva M. V., Zykina B. I., redaktory. Klinicheskie lekcii po UZ-diagnostike v perinatologii. M., 1990; 83–92.
15. Dement'eva G. M. Ocenka fizicheskogo razvitiya novorozhdenyh: posobie dlja vrachej. M., 2000. 25 s.
16. Ermakov AV, SV Kostyuk, MS Konkova, NA Egolina, EM Malinovskaya, NN Veiko. Extracellular DNA fragments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1137 (1): 41–6.
17. Muñoz-Hernández R, Medrano-Campillo P, Miranda ML, Macher HC, Praena-Fernández JM, Vallejo-Vaz AJ, et al. Total and Fetal Circulating Cell-Free DNA, Angiogenic, and Antiangiogenic Factors in Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Am J Hypertens*. 2017 Jul 1; 30 (7): 673–82. DOI: 10.1093/ajh/hpx024.
18. Hahn S, Giaglis S, Buser A, Hoesli I, Lapaire O, Hasler P. Cell-free nucleic acids in (maternal) blood: any relevance to (reproductive) immunologists? *J Reprod Immunol*. 2014 Oct; 104–105: 26–31. DOI: 10.1016/j.jri.2014.03.007.
19. Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien MÈ, Duval C, Chemtob S, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction*. 2016 Dec; 152 (6): R277–R292. Epub 2016 Sep 27.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ МЕРТВОРОЖДАЕМОСТИ В БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ, СТРАНАХ ЕВРОПЕЙСКОГО СОЮЗА И СОДРУЖЕСТВА НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ (1995–2014 ГГ.)

А. В. Корсаков^{1✉}, В. Хоффманн², Л. И. Пугач¹, Д. Г. Лагереv¹, В. В. Королик³, М. Б. Булацева³

¹ Брянский государственный технический университет, Брянск

² Институт общественной медицины Университета Грайфсвальда, секция эпидемиологии и общественного здравоохранения, Грайфсвальд, Германия

³ Кафедра гигиены, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Одним из важнейших показателей, позволяющих оценить уровень жизни населения и спрогнозировать рост его численности, служит частота случаев мертворождения детей. Целью работы было на основании официальных статистических данных за 1995–2014 гг. провести сравнительную оценку частоты мертворождаемости мальчиков и девочек в Брянской области, странах ЕС и СНГ. Установлено превышение частоты мертворожденных мальчиков над девочками, как по Брянской области (на 14,2%), так и по Российской Федерации в целом (на 9%), что подтверждает общемировые тенденции, выявившие повышенный риск мертворождения плодов мужского пола примерно на 10%. При сохранении существующих тенденций динамики мертворождаемости в Брянской области коэффициент мертворождений будет увеличиваться относительно общероссийских значений в период 2016–2021 гг. и достигнет 28,8% к 2021 г., причем разрыв между мальчиками и девочками будет возрастать и составит 32,6% к 2021 г.

Ключевые слова: мертворождаемость, мальчики, девочки, Брянская область, Российская Федерация, Европейский союз, Содружество Независимых Государств, Всемирная организация здравоохранения

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания 19.9992.2017/5.2. В рамках международного научно-образовательного сотрудничества Минобрнауки и DAAD по программе «Михаил Ломоносов».

✉ **Для корреспонденции:** Антон Вячеславович Корсаков
Бульвар 50-лет Октября, д. 7, г. Брянск, 241035; korsakov_anton@mail.ru

Статья получена: 15.06.2018 **Статья принята к печати:** 21.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.048

COMPARATIVE ASSESSMENT OF STILLBIRTH RATE IN BRYANSK REGION, EU AND CIS COUNTRIES (1995–2014)

Korsakov AV^{1✉}, Hoffmann V², Pugach LI¹, Lagerev DG¹, Korolik VV³, Bulatseva MB³

¹ Bryansk State Technical University, Bryansk

² University of Greifswald, Institute for Community Medicine, Section Epidemiology of Health Care and Community Health, Greifswald, Germany

³ Hygiene Department, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Stillbirth rate is one of the most important indicators allowing assessment of the population's living standards and forecasting its growth rate. This study aimed to compare the frequency of stillbirths in the Bryansk region, EU and CIS countries based on the official statistical data covering the period from 1995 to 2014. It was established that male stillbirth rate is greater than female stillbirth rate both in the Bryansk region and the Russian Federation (by 14.2% and 9%, respectively), which is consistent with the worldwide trend that has the male stillbirth risk 10% higher than that for girls. Provided the dynamics remain the same, 2016 to 2021 the share of stillbirths in the Bryansk region will continue to grow and reach 28.8% by 2021, which is greater than nationwide. The gender distribution will also grow to 32.6% (male stillbirths more common than female) by 2021.

Keywords: stillbirths, boys, girls, Bryansk region, Russian Federation, European Union, Commonwealth of Independent States, World Health Organization.

Funding: the study is a deliverable under the state assignment 19.9992.2017/5.2 in the context of the international research and educational cooperation between the Ministry of Education and Science and DAAD, part of the Mikhail Lomonosov program.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anton V. Korsakov
Boulevard 50-let Oktyabrya, 7, Bryansk, 241035; korsakov_anton@mail.ru

Received: 15.06.2018 **Accepted:** 21.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.048

По данным Всемирной организации здравоохранения [1], в 2009 г. в мире произошло около 2,6 млн случаев мертворождения. Ежедневно на свет появляется более 7 200 мертворожденных детей, при этом 98% из этих случаев мертворождения происходит в странах с низким и средним уровнем дохода. Согласно отчету ВОЗ [1], число случаев мертворождения в мире уменьшилось только

на 1,1% в год — с 3 млн в 1995 г. до 2,6 млн в 2009 г. Самая низкая в мире мертворождаемость за последние годы наблюдается в Финляндии (два мертворожденных ребенка на 1000 родившихся), самая высокая — в Нигерии и Пакистане (40 мертворожденных на 1000 родившихся) [1]. В 2011 г. в Непале коэффициент мертворождений составил 22,4 на 1000 родившихся, причем 80% этих

смертей происходило в течение периода беременности [2]. Наибольшее абсолютное число мертворождений в мире зарегистрировано в Индии — примерно 590 000 мертворождений в 2015 г. [3].

Кроме того, наблюдаются различия в частоте мертворождений в зависимости от пола плода. Результаты исследований более 30 млн рождений по всему миру, проведенных группой ученых из Эксетерского университета (Великобритания) [4], указывают на то, что риск мертворождения для мальчиков выше, чем для девочек примерно на 10%, это соответствует потере около 100 тыс. младенцев мужского пола в год. Причины такой разницы между полами пока неизвестны, они могут быть связаны, например, с особенностями развития и функционирования плаценты при беременности или с повышенной чувствительностью плода мужского пола к вредным факторам окружающей среды. Исключение составили только Китай и Индия, где процент мертворожденных мальчиков и девочек не различался. Это можно объяснить распространенностью селективных абортов в этих странах — они совершаются там гораздо чаще в случаях, если УЗИ показывает женский пол плода. При этом общий процент случаев мертворождения в этих странах был чуть выше, чем в среднем по миру [4].

Факторами риска мертворождения являются осложнения во время родов, возраст матери старше 35 лет, преэклампсия, отслойка плаценты, хронические инфекции матери во время беременности (бруцеллез, токсоплазмоз, листериоз, туберкулез, сифилис и др.), острые инфекции (ангина, грипп, воспаление легких и т. д.), высокое артериальное давление, сахарный диабет, заболевания сердца, легких, почек и других внутренних органов, употребление наркотиков [5–7], социально-экономическое неблагополучие, низкий уровень образования [8], а также загрязнение окружающей среды, задержка внутриутробного развития плода и врожденные пороки развития (ВПР) [9]. Отсутствие посещаемости антенатальной помощи имеет самую сильную связь с мертворождением и является потенциально изменяемым фактором риска [10].

Почти половина всех случаев мертворождения (1,2 млн случаев) происходит во время родов. Эти случаи смерти напрямую связаны с отсутствием квалифицированной помощи для матерей и детей в критически важное время. Две трети случаев происходят в сельских районах, где не всегда доступны специалисты по родовспоможению, в частности акушеры и врачи для оказания необходимой помощи во время родов, а в критических ситуациях — неотложной акушерской помощи, включая кесарево сечение [1]. В странах с высоким доходом доля мертворождений, возникающих во время родов, значительно снизилась при улучшении акушерской помощи; наоборот, число мертворождений не уменьшилось значительно [11]. Это указывает на то, что даже в странах с высокими доходами стратегии, основанные на выявлении беременностей с высоким риском, не преуспели в предотвращении мертворождения.

Примерно в четверти случаев причины мертворождения остаются невыясненными и эта проблема остается одной из приоритетных для медицины [4]. Очень важным шагом на пути ее решения считают открытие нового фактора, снижающего риск мертворождения, для выявления которого рекомендуется вести специальную статистику [4]. Таким фактором может быть наличие крупных ВПР у плода, что не совместимо с его жизнеспособностью и

служит причиной как спонтанных абортов (выкидышей) [9], так и абортов по медицинским показаниям, особенно у беременных, проживающих на радиоактивно-загрязненных территориях после Чернобыльской катастрофы [12].

Таким образом, основная задача здравоохранения — своевременно устранять патологические процессы у беременных как во время беременности (включая раннюю диагностику ВПР), так и в процессе родов и родоразрешения.

Следует отметить, что согласно официальному рейтингу регионов Российской Федерации по качеству жизни Брянская область в 2015 г. занимает 16 место из 18 регионов Центрального Федерального округа и 52 в общем рейтинге из 85 регионов РФ, а по уровню здоровья населения 67 место [13].

В связи с этими данными исследование динамики частоты мертворождаемости мальчиков и девочек в Брянской области, странах ЕС и СНГ на протяжении длительного периода — крайне важная и актуальная задача.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистические данные за 1995–2015 гг. по частоте мертворождений мальчиков и девочек в Брянской области и в России получены на основе официальных материалов территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Брянской области (Брянскстат) [14]. Частоту мертворождений в странах ЕС и СНГ за 1995–2014 гг. анализировали на основе информации, представленной на официальном сайте ВОЗ [15].

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Stata SE 14. В качестве среднего значения использовали выборочное среднее. Статистическую значимость отклонений проверяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

На основании имеющихся статистических данных производили расчет прогноза частоты мертворождаемости как по Брянской области, так и по Российской Федерации (РФ), причем отдельно для каждой из гендерных категорий: по мальчикам, по девочкам и всего (суммарно). Для этого методом наименьших квадратов была найдена линейная функция $y = ax + b$, наиболее точно аппроксимирующая статистические данные для каждой из указанных категорий. Были проанализированы данные за 2009–2015 гг. по Брянской области и за 2009–2014 гг. по РФ (поскольку данные за 2015 г. по РФ еще недоступны). По этой линейной функции нами был рассчитан прогноз на два трехлетия: 2016–2021 гг.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные по частоте мертворождаемости мальчиков, девочек и суммарно мальчиков и девочек в разрезе районов Брянской области за двадцатидвухлетний период (1995–2015) представлены на рис. 1–3.

Показано, что наибольшая частота мертворождений регистрируется у мальчиков Рогнединского (10,52 на 1000 родившихся), Жуковского (10,37), Навлинского (10,27) и Суземского (8,99) районов (рис. 1), а наименьшая — у мальчиков Гордеевского (4,40), Дубровского (5,06), Дятьковского (5,36) и Новозыбковского (5,64). Частота мертворождений по области колеблется от 4,40 до 10,52. Максимальные значения выявлены у мальчиков Рогнединского района, что больше показателей

Гордеевского в 2,4 раза. В г. Брянске данный показатель составляет 7,94.

Наибольшие значения коэффициента мертворождений у девочек регистрируются в Жирятинском (12,80), Погарском (9,57), Дубровском (8,77) и Климовском (8,59) районах, а наименьшие — в Злынковском (3,80), Гордеевском (4,02), Карачевском (4,20) и Красногорском (5,27). Максимальные значения выявлены в Жирятинском районе, что больше показателей Злынковского в 3,4 раза. В г. Брянске частота мертворождений девочек составляет 6,35, что меньше аналогичных показателей мертворожденных мальчиков на 20% (рис. 2).

Наибольшая частота мертворождений регистрируется у детей (суммарно мальчиков и девочек) Жирятинского (9,68), Рогнединского (9,09), Погарского (9,09) и Жуковского (8,53) районов, а наименьшая — у детей Гордеевского (4,21), Новозыбковского (5,36), Злынковского (5,49) и Карачевского (5,61) (рис. 3). Частота мертворождений по области колеблется от 4,21 до 9,09 случаев. Максимальные значения выявлены у детей Жирятинского района, что больше показателей Гордеевского в 2,2 раза. В г. Брянске данный показатель составляет 7,15.

Данные табл. 1 указывают, что частота мертворождений у мальчиков в среднем по Брянской области за двадцатилетний период (1995–2014 гг.) больше общероссийских значений на 16,5% ($p < 0,05$) и составляет 7,49 и 6,43, а у девочек на 11,2% ($p > 0,05$) и составляет 6,56 и 5,90. Частота мертворождений в Брянской

области суммарно у мальчиков и девочек превышает общероссийские показатели на 13,8% ($p < 0,05$), составляя 7,02 и 6,17. Коэффициент (частота) мертворождений у мальчиков по Брянской области превышает аналогичный коэффициент у девочек на 14,2%, составляя 7,49 и 6,56, по РФ — на 9,0%, составляя 6,43 и 5,90, хотя различия не достигают достоверного уровня ($p > 0,05$).

Данные табл. 2 показывают, что средняя частота мертворождаемости за 1995–2014 гг. в странах ЕС меньше чем в странах СНГ в 2,47 раза ($p < 0,001$). Наибольшие значения регистрируются в Армении (15,74), Украине (15,36), Грузии (14,30), Азербайджане (11,67), Таджикистане (10,99) и в целом по странам СНГ (12,17), наименьшие — в Чехии (2,98), Италии (3,10), Испании (3,43), Финляндии (3,47), Швеции (3,55) и в целом по странам ЕС (4,93). Из стран ЕС наибольший коэффициент мертворождений отмечается во Франции (8,00), Болгарии (7,49), Латвии (6,91) и Нидерландах (5,96). В странах СНГ частота мертворождений колеблется от 4,90 до 15,74, в странах ЕС от 2,98 до 8,00. В РФ частота мертворождений составляет $6,17 \pm 0,23$, что в 1,25 раза больше показателей ЕС, но в 1,97 раза меньше значений, чем в других странах СНГ (различия статистически достоверны, $p < 0,001$). Следует отметить, что только в трех странах ЕС — Франции, Болгарии и Латвии коэффициенты мертворождаемости выше, чем в РФ (8,0; 7,49 и 6,91 соответственно). В республике Беларусь коэффициент мертворождаемости в 1,26 раза меньше, чем в РФ, и в 2,48 раза меньше,

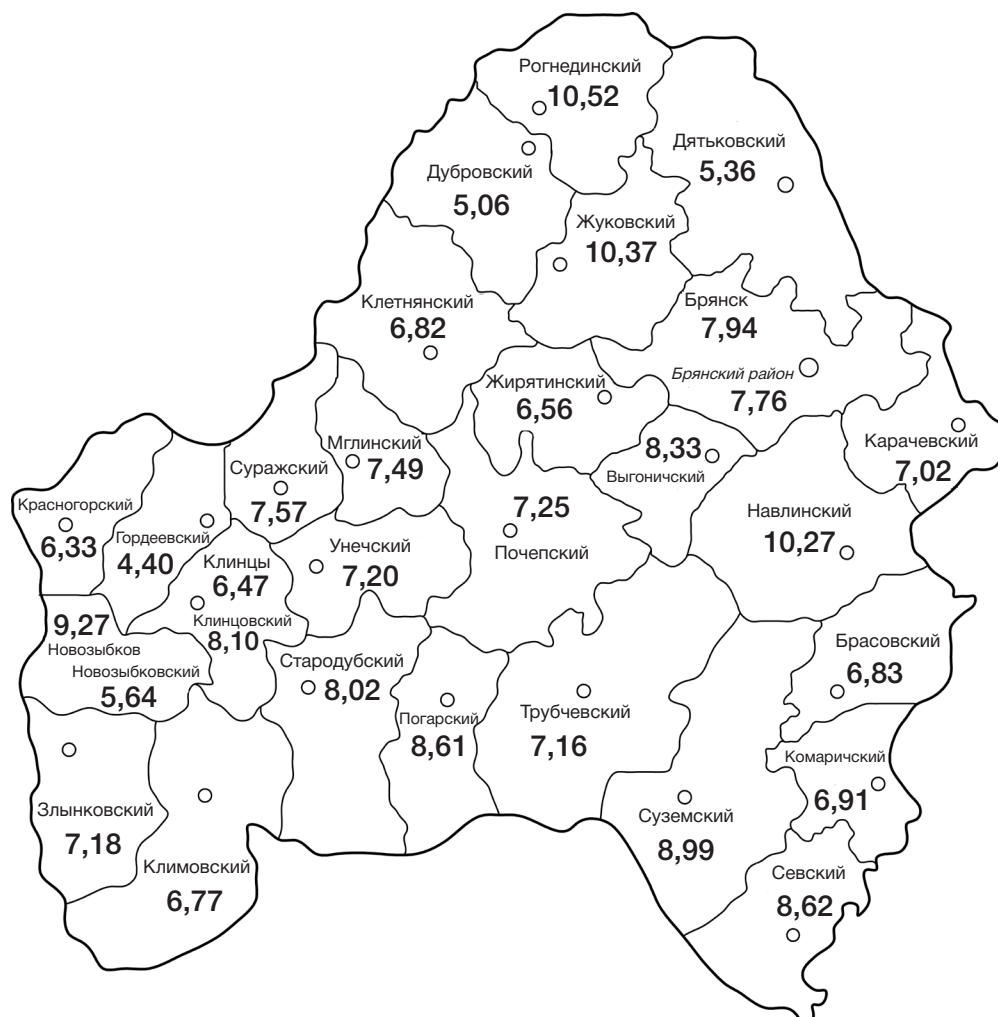


Рис. 1. Частота мертворождаемости мальчиков в Брянской области в 1995–2015 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

чем в странах СНГ (4,90), он практически совпадает с показателем ЕС (4,93).

Динамика частоты мертворождаемости в Брянской области, РФ, странах ЕС и СНГ в 1995–2014 гг. (рис. 4) подтверждает показатели, представленные в табл. 2, и указывает, что самая высокая частота мертворождений регистрируется в странах СНГ. Максимальный коэффициент мертворождений отмечен здесь в 1997–1998 гг. (17,1), затем с 1999 г. он постепенно снижается, достигнув минимального уровня в 2011–2014 гг. (8,9). В странах ЕС, в отличие от стран СНГ, резких колебаний коэффициента мертворождаемости за двадцатилетний период наблюдения (1995–2014 гг.) не выявлено, он составил от 4,6 до 5,1. В Брянской области колебания коэффициента мертворождаемости составляют от 4,3 до 9,9, при этом динамика носит скачкообразный характер: на уровне общероссийских значений в 1995 и 1996 гг. (7,4), увеличение в 1997 г. до 9,9, затем уменьшение и стабилизация показателя в 1998–2005 гг. (7,2–8,5). В 2006–2010 гг. регистрируется снижение частоты мертворождений до общероссийских значений (4,3–5,2) и в 2011–2014 гг. опять увеличение (5,8–7,9). В РФ динамика частоты мертворождаемости в 1995–1997 гг. находится примерно на одном уровне (7,4–8,0), затем плавно снижается с 1998 до 2011 гг. (составив в 2011 г. 4,5), в последние три года возрастает до 6,2.

В Чехии, Финляндии и Германии коэффициент мертворождаемости колеблется от 2,3 до 4,8, не превышая средние значения стран ЕС (рис. 5). В отличие от Чехии,

Финляндии и Германии, во Франции в 2002 г. зарегистрирован резкий скачок коэффициента мертворождаемости (в 1,7 раза) — со стабильных в 1995–2001 гг. среднеевропейских случаев (4,6–5,3) до 8,2, который достиг максимальных значений в 2009 г. (11,7) и продолжил оставаться на высоком и примерно одинаковом уровне в 2010–2014 гг. (9,6–10,2).

В нашей работе был рассчитан прогноз частоты мертворождаемости детей на 2017–2021 гг. с помощью следующей методики: по данным за 1986–2016 вычисляли линейную регрессию $y = ax + b$, где y — частота мертворождаемости, x — год в кратком формате (например, 9 или 16). Затем по этой формуле для $x = 17, \dots, 21$ вычисляли y . Результаты заносили в таблицу и строили график.

Для мальчиков Брянской области $y = 0,730x - 1,901$.

Для девочек Брянской области $y = 0,464x + 0,379$.

Для детей обоего пола Брянской области $y = 0,597x - 0,761$.

Для мальчиков РФ $y = 0,407x + 0,915$.

Для девочек РФ $y = 0,374x + 0,966$.

Для детей обоего пола РФ $y = 0,391x + 0,940$.

Как показывают результаты вычислений, при сохранении существующих тенденций частота мертворождаемости в Брянской области будет увеличиваться, причем разрыв между мальчиками и девочками будет возрастать и достигнет 32,6% к 2021 г. (рис. 6 и 7).

По прогнозу разрыв между числом мертворожденных в Брянской области и в Российской Федерации существенно возрастет и достигнет 28,8% к 2021 г.

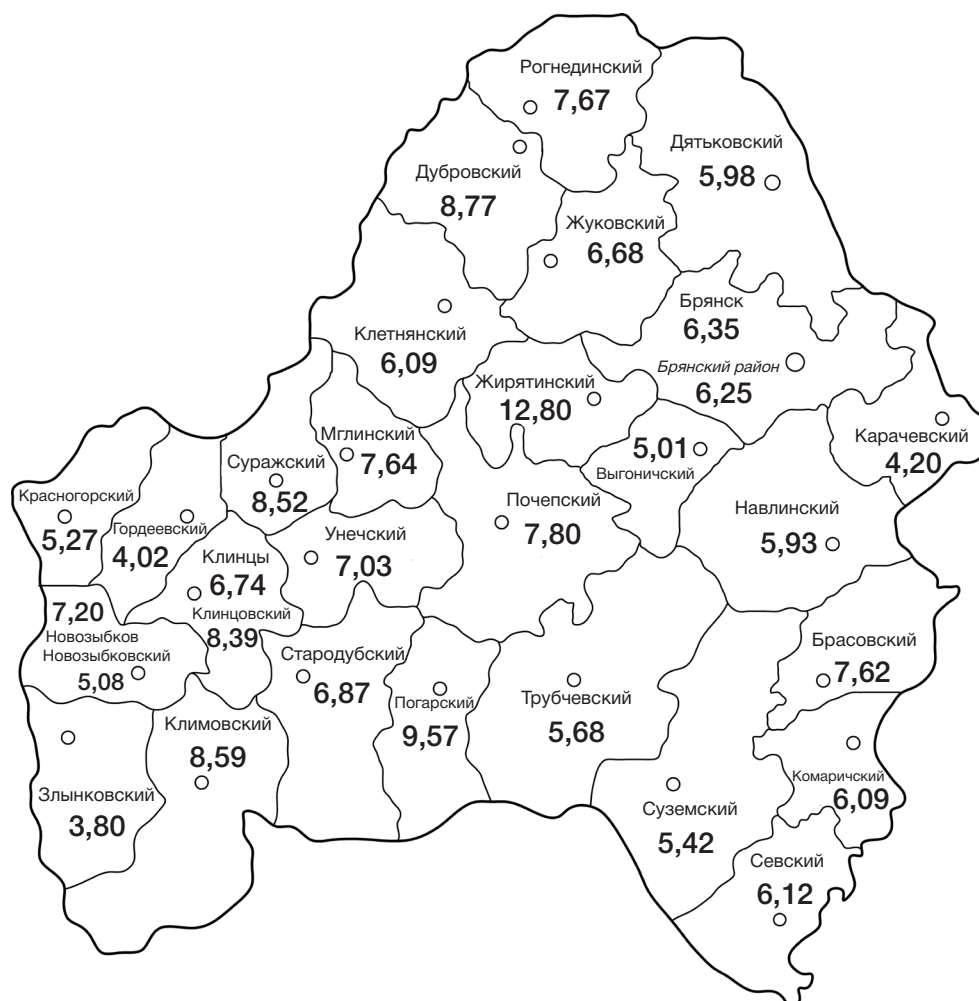


Рис. 2. Частота мертворождаемости девочек в Брянской области в 1995–2015 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценивая приведенные выше данные, необходимо прежде всего отметить, что рассчитанный нами за двадцатилетний период (1995–2014 гг.) коэффициент мертворождаемости мальчиков, как по Брянской области, так и по РФ превышает аналогичный коэффициент девочек на 14,2 и 9,0%. Полученные результаты подтверждают общемировые тенденции, выявившие повышенный риск мертворождения плодов мужского пола примерно на 10% [4].

Поскольку Брянская область в 2015 г., согласно официальному рейтингу регионов РФ, по качеству жизни занимает 16 место из 18 регионов ЦФО и 52 в общем рейтинге из 85 регионов РФ, а по уровню здоровья населения 67 место (Рейтинг российских регионов, 2016...) [13], то полученные нами значения частоты мертворождений подтверждают данную статистику — как у мальчиков, так и у девочек в целом по Брянской области на протяжении двадцатилетнего периода (1995–2014 гг.) регистрируется превышение коэффициента

мертворождаемости по сравнению с общероссийскими значениями на 16,5 и 11,2% соответственно.

Рассчитанные коэффициенты мертворождаемости за 1995–2014 гг. в странах ЕС и странах СНГ подтверждают отчет ВОЗ, согласно которому 98% случаев мертворождения происходит в странах с низким и средним уровнем дохода [1], и средняя частота мертворождаемости в странах СНГ больше, чем в странах ЕС в 2,5 раза ($p < 0,001$).

В целом по странам ЕС динамика частоты мертворождаемости за двадцатилетний период наблюдения (1995–2014 гг.) стабильно удерживается примерно на одном уровне, не превышая 10,9% (4,6–5,1), в то время как в странах СНГ и отдельно в Брянской области регистрируются резкие колебания коэффициента мертворождаемости, достигающие 92,1% (8,9–17,1) и 122,0% (4,2–9,1).

В трех странах ЕС — Франции, Латвии и Болгарии — частота мертворождаемости выше, чем в РФ, хотя, согласно мировому рейтингу по уровню жизни 142 стран

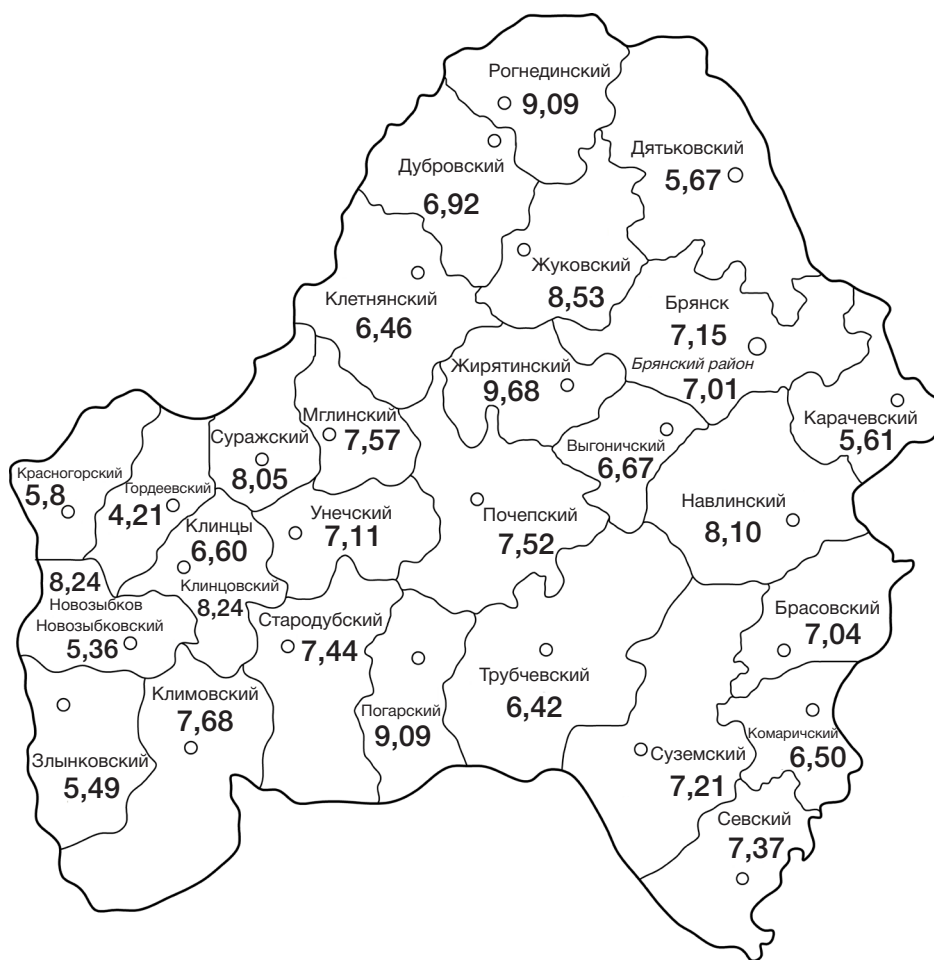


Рис. 3. Частота мертворождаемости суммарно мальчиков и девочек в Брянской области в 1995–2015 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

Таблица 1. Частота мертворождаемости мальчиков и девочек (на 1000 родившихся; $M \pm m$) в Брянской области и РФ (1995–2014 гг.)

Страна, регион	Частота мертворождаемости мальчиков, ‰	Частота мертворождаемости девочек, ‰	Частота мертворождаемости суммарно мальчиков и девочек, ‰
Брянская область	$7,49 \pm 0,41$	$6,56 \pm 0,27$	$7,02 \pm 0,32$
РФ	$6,43 \pm 0,25$	$5,90 \pm 0,22$	$6,17 \pm 0,23$

Примечание: различия между мертворождением мальчиков и девочек в Брянской обл. и мальчиков и девочек в РФ, $p > 0,05$;
 различия между мертворождением мальчиков в Брянской обл. и РФ, $p < 0,05$;
 различия между мертворождением девочек в Брянской обл. и РФ, $p > 0,05$;
 различия между мертворождением суммарно мальчиков и девочек в Брянской обл. и РФ, $p < 0,05$.

Таблица 2. Частота мертворождаемости суммарно мальчиков и девочек (на 1000 родившихся; $M \pm m$) в странах ЕС и СНГ (1995–2014 гг.)

Страна, регион	Частота мертворождаемости (1995 – 2014), ‰	Достоверность различий с Европейским союзом, p
<i>Содружество Независимых Государств</i>	<i>12,17 ± 0,69</i>	<i>$p < 0,001$</i>
<i>Европейский Союз</i>	<i>4,93 ± 0,03</i>	–
Армения	15,74 ± 0,55	$p < 0,001$
Украина	15,36 ± 1,46	$p < 0,001$
Грузия	14,30 ± 0,78	$p < 0,001$
Азербайджан	11,67 ± 0,30	$p < 0,001$
Таджикистан	10,99 ± 0,24	$p < 0,001$
Киргизия	9,94 ± 0,76	$p < 0,001$
Молдавия	9,38 ± 0,51	$p < 0,001$
Туркмения	9,20 ± 1,01	$p < 0,001$
Казахстан	8,64 ± 0,30	$p < 0,001$
Узбекистан	8,06 ± 0,82	$p < 0,001$
Франция	8,00 ± 0,55	$p < 0,001$
Болгария	7,49 ± 0,09	$p < 0,001$
Латвия	6,91 ± 0,34	$p < 0,001$
Российская Федерация	6,17 ± 0,23	$p < 0,001$
Нидерланды	5,96 ± 0,12	$p < 0,001$
Сербия	5,42 ± 0,12	$p < 0,001$
Литва	5,41 ± 0,18	$p < 0,05$
Ирландия	5,34 ± 0,20	$p > 0,05$
Румыния	5,25 ± 0,22	$p > 0,05$
Великобритания	5,25 ± 0,07	$p < 0,001$
Эстония	5,21 ± 0,36	$p > 0,05$
Польша	5,08 ± 0,23	$p > 0,05$
Словения	5,00 ± 0,15	$p > 0,05$
Республика Беларусь	4,90 ± 0,42	$p > 0,05$
Венгрия	4,82 ± 0,14	$p > 0,05$
Греция	4,74 ± 0,21	$p > 0,05$
Мальта	4,63 ± 0,31	$p > 0,05$
Дания	4,63 ± 0,13	$p < 0,05$
Люксембург	4,59 ± 0,30	$p > 0,05$
Бельгия	4,48 ± 0,08	$p < 0,001$
Португалия	4,43 ± 0,26	$p > 0,05$
Хорватия	4,27 ± 0,12	$p < 0,001$
Швейцария	4,09 ± 0,08	$p < 0,001$
Австрия	3,88 ± 0,08	$p < 0,001$
Германия	3,81 ± 0,07	$p < 0,001$
Словакия	3,79 ± 0,11	$p < 0,001$
Швеция	3,55 ± 0,08	$p < 0,001$
Финляндия	3,47 ± 0,13	$p < 0,001$
Испания	3,43 ± 0,07	$p < 0,001$
Италия	3,10 ± 0,13	$p < 0,001$
Чехия	2,98 ± 0,08	$p < 0,001$

мира в 2015 г. [16]. Россия занимает 58 место, а Франция, Латвия и Болгария находятся выше в списке, занимая 22, 40 и 51 место.

Неожиданные результаты частоты мертворождений получены по Франции, когда в 2002 г. был зарегистрирован резкий скачок коэффициента мертворождаемости (в 1,7 раза) — со стабильных в 1995–2001 гг. среднеевропейских случаев (4,6–5,3) до 8,2, он достиг максимальных значений в 2009 г. (11,7) и продолжал оставаться на

высоком и примерно одинаковом уровне в 2010–2014 гг. (9,6–10,2). Полученные данные могут быть связаны с как миграционными процессами, так и с другими факторами и требуют проведения дополнительных исследований.

Следует отметить, что в республике Беларусь регистрируется самый низкий коэффициент мертворождаемости среди стран СНГ (4,90), что меньше общероссийских значений на 25,9% и практически совпадает с показателем стран ЕС (4,93).

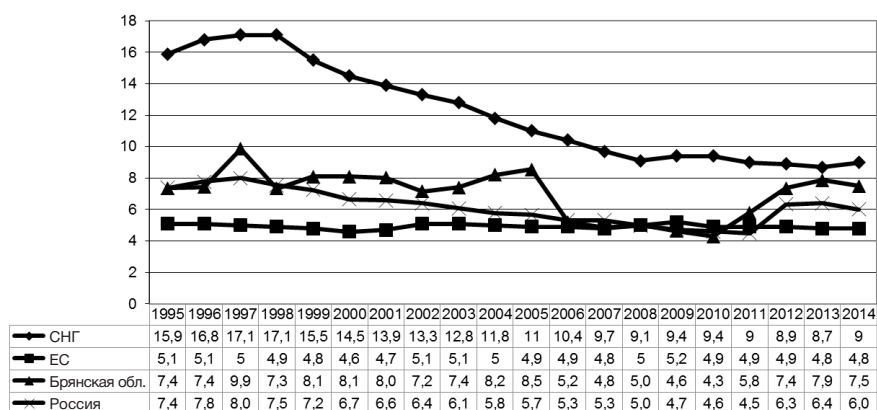


Рис. 4. Динамика частоты мертворождаемости суммарно мальчиков и девочек в Брянской области, РФ, странах ЕС и СНГ в 1995–2014 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

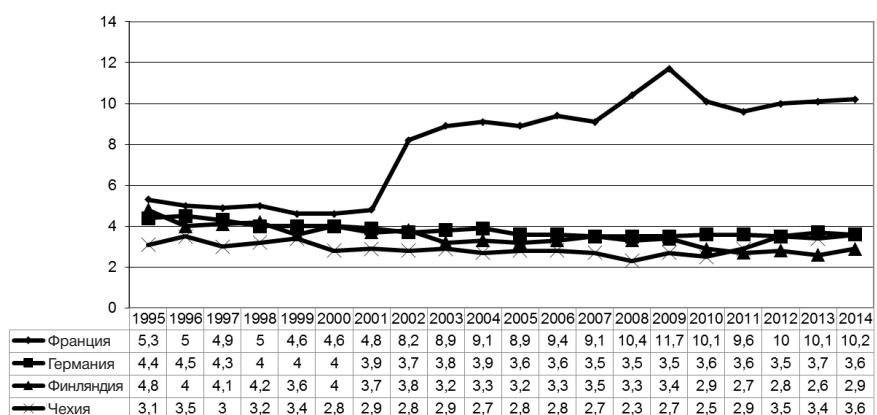


Рис. 5. Динамика частоты мертворождаемости суммарно мальчиков и девочек во Франции, Германии, Финляндии и Чехии в 1995–2014 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

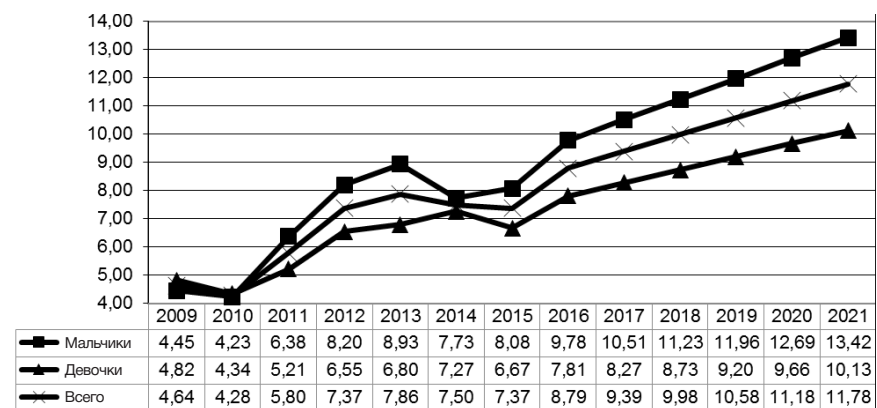


Рис. 6. Динамика частоты мертворождаемости мальчиков и девочек в Брянской области в 2009–2015 гг. и линейный прогноз на 2016–2021 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

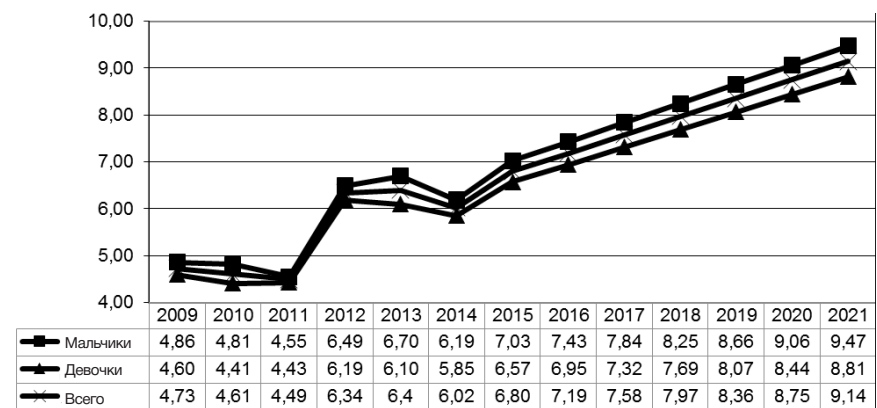


Рис. 7. Динамика частоты мертворождаемости мальчиков и девочек в РФ в 2009–2014 гг. и линейный прогноз на 2015–2021 гг. (на 1000 родившихся, ‰)

Поскольку примерно в четверти случаев причины мертворождения остаются невыясненными [4], а одним из факторов повышенной частоты мертворождаемости может быть наличие крупных ВПР у плода, то представляется интересным провести сравнительную оценку динамики частоты мертворождаемости на территории Брянской области с учетом плотности радиоактивного загрязнения районов долгоживущими радионуклидами вследствие Чернобыльской катастрофы, а также с учетом химического загрязнения окружающей среды вследствие работы промышленных предприятий и автотранспорта, и сравнить частоту мертворождаемости с другими регионами РФ, Украины и республики Беларусь, пострадавшими вследствие Чернобыльской катастрофы.

Проведенный нами прогноз частоты мертворождений в Брянской области и РФ в целом на 2016–2021 гг. выявил тревожные перспективы и требует не только научного анализа, но и управленческих решений со стороны руководства здравоохранением области, поскольку при сохранении существующих тенденций число мертворожденных в Брянской области будет увеличиваться относительно общероссийских значений и достигнет 28,8% к 2021 г., причем разрыв между мальчиками и девочками будет возрастать и составит 32,6%.

ВЫВОДЫ

Коэффициент мертворождаемости мальчиков как по Брянской области, так и по РФ на протяжении двадцатилетнего периода (1995–2014 гг.) превышает аналогичный коэффициент девочек на 14,2 и 9,0%, что подтверждает общемировые тенденции к повышению риска мертворождения плодов мужского пола примерно на 10%. Как у мальчиков, так и у девочек в целом по Брянской области регистрируется превышение коэффициента мертворождаемости по сравнению с общероссийскими значениями на 16,5 и 11,2% соответственно. Частота мертворождаемости в странах СНГ больше, чем в странах ЕС в 2,5 раза, в РФ — в 1,3 раза больше, чем в странах ЕС ($p < 0,001$).

Наибольший коэффициент мертворождаемости среди стран СНГ регистрируется в Армении (15,7), наименьший в Беларуси (4,9), среди стран ЕС — во Франции (8,0) и Чехии (3,0) соответственно.

При сохранении существующих тенденций динамики мертворождаемости в Брянской области коэффициент мертворождений будет увеличиваться относительно общероссийских значений в период 2016–2021 гг. и достигнет 28,8% к 2021 г., причем разрыв между мальчиками и девочками будет возрастать и составит 32,6%.

Литература

1. Статистические данные ВОЗ по числу мертворождений в мире в 2009. Доступно по ссылке: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/maternal_perinatal/stillbirth/Press_release_stillbirths_2011/ru/
2. Lawn JE, Blencowe H, Oza S, You D, Lee AC, Waiswa P, et al. Lancet Every Newborn Study Group: Every Newborn: progress, priorities, and potential beyond survival. *Lancet*. 2014; 384 (9938): 189–205. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60496-7.
3. Blencowe H, Cousens S, Jassir FB, Say L, Chou D, Mathers C, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *The Lancet Global health*. 2016; 4 (2): e98–e108. Epub 2016/01/23. DOI: 10.1016/S2214-109X(15)00275-2.
4. Mondal D, Galloway T, Bailey T, et al. Elevated risk of stillbirth in males: systematic review and meta-analysis of more than 30 million births. *BMC Medicine*. 2014. Available from: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0220-4>
5. Getahun D, Ananth CV, Kinzler WL. Risk factors for antepartum and intrapartum stillbirth: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 196 (6): 499–507. DOI: 10.1016/j.ajog.2006.09.017.
6. Salihu HM, Wilson RE, Alio AP, Kirby RS. Advanced maternal age and risk of antepartum and intrapartum stillbirth. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008; 34 (5): 843–50. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2008.00855.x.
7. Facchinetti F, Alberico S, Benedetto C, Cetin I, Cozzolino S, Di Renzo GC, et al. Italian Stillbirth Study Group: a multicenter, case-control study on risk factors for antepartum stillbirth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011; 24 (3): 407–10. DOI: 10.3109/14767058.2010.496880.
8. Ghimire PR, Agho KE, Renzaho A, Christou A, Nisha MK, Dibley M, et al. Socio-economic predictors of stillbirths in Nepal (2001–2011). *PLoS One*. 2017 Jul 13; 12 (7): e0181332. DOI: 10.1371/journal.pone.0181332. eCollection 2017.
9. Корсаков А. В., Яблоков А. В., Трошин В. П., Пугач Л. И., Сидоров И. В., Жилин А. В. и др. Динамика частоты врожденных пороков развития у детского населения Брянской области, проживающего в условиях радиационного загрязнения (1991–2012). *Здравоохранение Российской Федерации*. 2014; (6): 49–53.
10. Ashish KC, Nelin V, Wrammert J, Ewald U, Vitrakoti R, Baral GN, et al. Risk factors for antepartum stillbirth: a case-control study in Nepal. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2015 Jul 5; 15: 146. DOI: 10.1186/s12884-015-0567-3.
11. Goldenberg RL, McClure EM, Bann CM. The relationship of intrapartum and antepartum stillbirth rates to measures of obstetric care in developed and developing countries. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007; 86 (11): 1303–9. DOI: 10.1080/00016340701644876.
12. Корсаков А. В., Яблоков А. В., Гергер Э. В., Пугач Л. И. Динамика частоты полидактилии, редукционных пороков конечностей и множественных врожденных пороков развития у новорожденных радиоактивно загрязненных территорий Брянской области (1999–2014). *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2016; 56 (4): 397–404.
13. Рейтинг российских регионов по качеству жизни – 2015. М.: ООО Рейтинговое агентство РИА Рейтинг; 2016. 62 с.
14. Информационная справка по уровню мертворождений по Брянской области и Российской Федерации с 1995 по 2015 гг. (договор № 65-АРМ). Брянск: управление Федеральной службы государственной статистики по Брянской области; 2016. 21 с.
15. Частота мертворождений в 1970–2014 гг. в разных странах мира по данным ВОЗ. Доступно по ссылке: http://gateway.euro.who.int/ru/visualizations/choropleth-map-charts/hfa_82-fetal-deaths-per-1000-births/#table
16. Таблица уровня жизни 142 стран мира в 2015. <http://gotoroad.ru/best/indexlife>

References

1. Statisticheskie dannye VOZ po chislu mertvorozhdenij v mire v 2009. Dostupno po ssylke: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/maternal_perinatal/stillbirth/Press_release_stillbirths_2011/ru/

2. Lawn JE, Blencowe H, Oza S, You D, Lee AC, Waiswa P, et al. Lancet Every Newborn Study Group: Every Newborn: progress, priorities, and potential beyond survival. *Lancet*. 2014; 384 (9938): 189–205. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60496-7.
3. Blencowe H, Cousens S, Jassir FB, Say L, Chou D, Mathers C, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *The Lancet Global health*. 2016; 4 (2): e98–e108. Epub 2016/01/23. DOI: 10.1016/S2214-109X(15)00275-2.
4. Mondal D, Galloway T, Bailey T, et al. Elevated risk of stillbirth in males: systematic review and meta-analysis of more than 30 million births. *BMC Medicine*. 2014. Available from: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0220-4>
5. Getahun D, Ananth CV, Kinzler WL. Risk factors for antepartum and intrapartum stillbirth: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 196 (6): 499–507. DOI: 10.1016/j.ajog.2006.09.017.
6. Salihu HM, Wilson RE, Alio AP, Kirby RS. Advanced maternal age and risk of antepartum and intrapartum stillbirth. *J ObstetGynaecol Res*. 2008; 34 (5): 843–50. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2008.00855.x.
7. Facchinetti F, Alberico S, Benedetto C, Cetin I, Cozzolino S, Di Renzo GC, et al. Italian Stillbirth Study Group: a multicenter, case-control study on risk factors for antepartum stillbirth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011; 24 (3): 407–10. DOI: 10.3109/14767058.2010.496880.
8. Ghimire PR, Agho KE, Renzaho A, Christou A, Nisha MK, Dibley M, et al. Socio-economic predictors of stillbirths in Nepal (2001–2011). *PLoS One*. 2017 Jul 13; 12 (7): e0181332. DOI: 10.1371/journal.pone.0181332. eCollection 2017.
9. Korsakov A. V., Jablovkov A. V., Troshin V. P., Pugach L. I., Sidorov I. V., Zhilin A. V. i dr. Dinamika chastoty vrozhdennyh porokov razvitiya u detskogo naseleniya Brjanskoj oblasti, prozhivajushhego v usloviyah radiacionnogo zagrazneniya (1991–2012). *Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii*. 2014; (6): 49–53.
10. Ashish KC, Nelin V, Wrammert J, Ewald U, Vitrakoti R, Baral GN, et al. Risk factors for antepartum stillbirth: a case-control study in Nepal. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2015 Jul 5; 15: 146. DOI: 10.1186/s12884-015-0567-3.
11. Goldenberg RL, McClure EM, Bann CM. The relationship of intrapartum and antepartum stillbirth rates to measures of obstetric care in developed and developing countries. *ActaObstetGynecol Scand*. 2007; 86 (11): 1303–9. DOI: 10.1080/00016340701644876.
12. Korsakov A. V., Jablovkov A. V., Geger' Je. V., Pugach L. I. Dinamika chastoty polidaktilii, redukcionnyh porokov konechnostej i mnozhestvennyh vrozhdennyh porokov razvitiya u novorozhdennyh radioaktivno zagraznennyh territorij Brjanskoj oblasti (1999–2014). *Radiacionnaja biologija. Radiojekologija*. 2016; 56 (4): 397–404.
13. Rejting rossijskih regionov po kachestvu zhizni – 2015. M.: OOO Rejtingovoe agentstvo RIA Rejting; 2016. 62 s.
14. Informacionnaja spravka po urovnju mertvorozhdenij po Brjanskoj oblasti i Rossijskoj Federacii s 1995 po 2015 gg. (dogovor # 65-ARM). Brjansk: upravlenie Federal'noj sluzhby gosudarstvennoj statistiki po Brjanskoj oblasti; 2016. 21 s.
15. Chastota mertvorozhdenij v 1970–2014 gg. v raznyh stranah mira po dannym VOZ. Dostupno po ssylke: http://gateway.euro.who.int/ru/visualizations/choropleth-map-charts/hfa_82-fetal-deaths-per-1000-births/#table
16. Tablica urovnja zhizni 142 stran mira v 2015. <http://gotoroad.ru/best/indexlife>

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТОКСОКАРОЗНОЙ ИНВАЗИИ У ДОМАШНИХ СОБАК И КОШЕК В ГОРОДСКИХ УСЛОВИЯХ

О. П. Курносова¹, И. М. Одоевская^{1✉}, С. Петкова², В. Дильчева²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К. И. Скрыбина, Москва

² Кафедра экспериментальной паразитологии,

Институт экспериментальной морфологии, патологии и антропологии с музеем, Болгарская академия наук, София, Болгария

Токсокароз — один из самых распространенных гельминтозов собак и кошек. Заболевание является зоонозом и представляет серьезную проблему для отечественного здравоохранения. В городской среде создаются благоприятные условия для передачи токсокар от домашних животных к человеку, при этом почва играет ведущую роль в распространении данной инвазии. С целью изучения интенсивности инвазии токсокарами домашних собак и кошек, проживающих на территории г. Москвы, в течение 7 лет проводили исследование фекалий флотационным методом. Показано, что в среднем интенсивность инвазии токсокарами у домашних собак составляет 2,43%, но при этом зараженность щенков в 2 раза выше, чем взрослых особей и составляет 5,53%. Средняя интенсивность инвазии у взрослых кошек составляет 3,97%, а у котят — 10,44%. В целом зараженность кошек токсокарами составляет 5,75%. Исследования показали, что в целом зараженность кошек токсокарозом в 2 раза выше, чем у собак, во всех возрастных группах. Стабильная зараженность домашних животных данным видом гельминтов делает их постоянным источником обсеменения городской среды яйцами токсокар, что создает напряженную эпидемическую обстановку в плане возможности заражения людей ларвальной формой токсокароза.

Ключевые слова: распространенность токсокар, токсокароз, собаки, кошки

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-16-00026.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Михайловна Одоевская
ул. Большая Черемушнская, д. 28, Москва, 117218; odoevskayaim@rambler.ru

Статья получена: 16.06.18 **Статья принята к печати:** 10.08.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.044

PREVALENCE OF TOXOCARA INFECTION IN DOMESTIC DOGS AND CATS IN URBAN ENVIRONMENT

Kurnosova OP¹, Odoevskaya IM^{1✉}, Petkova S², Dilcheva V²

¹ Skryabin All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants, Moscow

² Department of Experimental Parasitology,

Institute of experimental morphology, pathology and anthropology with museum, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Toxocariasis is the type of helminthic infection found in dogs and cats most often. It is a zoonotic disease that presents a serious threat to the national public health. Urban environment favors transmission of toxocara from animals to people; soil is the key element of such transmission. To learn the degree of toxocara invasion in domestic cats and dogs living in Moscow, we studied their feces for 7 years applying the flotation method. We found that in domestic dogs the intensity of toxocara invasion was 2.43%, but there is a big difference between puppies and adult animals: 5.53% of the former, twice as much as the latter, suffered from the invasion. The intensity of infection in adult cats was 3.97%; kittens, same as puppies, were more prone to host toxocara: 10.44% of those examined did. In general, 5.75% of cats had toxocara, which is twice as much compared to dogs; the figure applies to all ages. Stable infestation of domestic animals with this species of helminths makes them a constant source of toxocara eggs contamination in urban environments, which ups the risk of larvae toxocariasis for people.

Keywords: prevalence of toxocariasis, toxocara, domestic dogs, domestic cats

Funding: this work was supported by the Russian Science Fund, Project #14-1600026.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina M. Odoevskaya
Bolshaya Cheremushkinskaya 28, Moscow, 117218; odoevskayaim@rambler.ru

Received: 16.06.18 **Accepted:** 10.08.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.044

Токсокароз это паразитарное заболевание собак и кошек, вызываемое нематодами рода *Toxocara*. Половозрелые гельминты локализуются в тонком отделе кишечника плотоядных. Попадая вместе с экскрементами зараженных животных в почву, яйца токсокар длительное время сохраняют свою жизнеспособность и инвазионность. Токсокароз у собак и кошек является одним из самых распространенных гельминтозов в мегаполисе Москва. По некоторым данным показатели экстенсивности инвазии у домашних собак колеблются от 11,9 до 18,1%,

а зараженность бродячих собак в городе достигает 55% [1, 2]. Показатели интенсивности токсокарозной инвазии у домашних кошек доходят до 11,1%. При этом наиболее восприимчивыми остаются молодые особи благодаря существованию пренатального и трансмаммарного механизма передачи инвазии [3]. Максимальные показатели интенсивности инвазии приходятся на бездомных щенков и котят и составляют 100 и 57,1% соответственно [4, 5].

Почва играет ведущую роль в сохранении и распространении токсокароза [6]. Основным источником

загрязнения инвазионным началом являются фекалии больных животных, причем яйца токсокар, особенно инвазионные, обладают наибольшей устойчивостью к неблагоприятным воздействиям факторов внешней среды [7]. При изучении обсемененности почвы на территории города Москвы установлено, что в разных административных округах и в среднем по городу это уровень составляет 13,5% (с вариацией от 1,1 до 46,9%), причем средний показатель обсемененности почвы яйцами токсокар игровых площадок территорий жилых домов составил 14,8% [8, 9]. По результатам исследований, проведенных на территории г. Москвы, в 1 кг почвы количество обнаруженных яиц токсокар составляло от 25 до 500 экз./кг [1]. Максимальные показатели уровня обсемененности почвы яйцами токсокар выявлены на площадках для выгула собак.

Токсокароз человека в основном представляет собой хронически протекающее заболевание. При заражении человека личинки токсокар током крови разносятся по организму, что приводит к повреждению различных тканей и органов и сенсибилизации продуктами обмена паразита. Токсокароз у человека может протекать с разными клиническими проявлениями, но в основном характеризуется поражением внутренних органов, в первую очередь печени и легких, также нередко поражаются глаза и центральная нервная система. Кожный токсокароз вызывает изменения характерные для *larva migrans*. Степень выраженности заболевания зависит от количества проглоченных инвазионных яиц, частоты реинвазии и ответной реакции организма на повреждающее и антигенное воздействие мигрирующих личинок, от места основной их локализации. Совокупность таких факторов во многом влияет на степень развития патологических изменений и на прогноз заболевания в целом [10].

Заражению наиболее часто подвержены взрослые люди, входящие в профессиональную группу риска и маленькие дети с несовершенными навыками личной гигиены. Чаще оно происходит в сельской местности, где контакт с почвой больше [11], а домашних животных не дегельментизируют с профилактической целью. Не смотря на хорошо развитую социальную инфраструктуру, в крупных городах также существует угроза заражения городского населения [12]. Постоянно увеличивающееся количество поголовья домашних собак, свободная миграция бездомных животных создают предпосылки для распространения и поддержания на локальных участках территории города очагов инвазии токсокарами. Нередко небольшие парки и скверы регулярно используются для выгула большого количества домашних собак

без последующей уборки их экскрементов. Детские площадки, как правило, не изолированы от проникновения на них собак и кошек, а песочницы не имеют крышек или брезентовых покрытий. В связи с особенностью бездомных кошек закапывать свои экскременты в песок или рыхлый грунт, высока вероятность превращения детских песочниц в резервуар токсокарозной инфекции для маленьких детей.

Исследования зараженности населения токсокарозом и изучение степени серопозитивности населения к антигенам этих нематод проводятся постоянно различными исследователями во всех регионах нашей страны. Показатели зараженности людей варьируют. В целом по России с 2003–2007 годов отмечено увеличение заражаемости токсокарозом людей в 2 раза [12]. Так в Туле уровень серопозитивности населения составляет 19,3%, в Екатеринбурге — 2%, 8,6% — во Владивостоке, до 20,8% — в республике Алтай, в Москве — до 17%. Показатели зараженности людей на юге России находятся в пределах 14,6–36,4%, что превышает показатели для других территорий страны в 2–3 раза [5, 12–15].

Эпидемическая роль нематод *T.canis* и *T.cati* до сих пор не установлена. Зарегистрированы единичные случаи достоверного заражения людей кошачьим видом токсокар с поражением глаз и внутренних органов [16]. Серологическая идентификация токсокароза доступными методами исследования на сегодняшний день не дает возможности установить, каким именно видом нематод заражены пациенты.

Целью нашего исследования было изучение распространенности токсокарозной инвазии желудочно-кишечного тракта домашних собак и кошек г. Москвы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с 2011 по 2017 г. на базе ветеринарной лаборатории «Пастер» и института ВНИИП им. К. И. Скрябина в г. Москве. Всего проанализировано 1632 пробы фекалий домашних собак и 1146 проб фекалий домашних кошек. Пробы фекалий животных в лабораторию доставлялись в специальных пластиковых контейнерах или в стеклянной посуде.

Фекалии животных исследовали флотационным методом [17] с использованием раствора аммиачной селитры плотностью 1,24. Микроскопию проводили при увеличении $\times 10$, $\times 40$ с использованием биологического микроскопа Биолам (ЛОМО; Россия). После исследования образцы материала обеззараживали автоклавированием в течение 2 ч при давлении 1,5 атм.

Таблица 1. Показатели зараженности токсокарами домашних собак

Год исследования	Щенки всего	Из них заражены	ЭИ(%)	Взрослые собаки	Из них заражены	Э (%)	Всего	Из них заражены	ЭИ (%)
2011	13	1	7,69	35	1	2,85	48	2	4,16
2012	83	2	2,4	225	3	1,33	308	5	1,62
2013	74	8	10,8	219	3	1,36	293	11	3,75
2014	64	3	4,68	195	3	1,53	259	6	2,31
2015	97	4	4,12	201	2	1,43	298	6	2,01
2016	75	3	4	185	2	1,08	260	5	1,92
2017	46	4	8,6	120	1	0,83	166	5	3,01
Итого	452	25	5,53	1180	15	1,27	1632	40	2,45

Примечание: ЭИ — экстенсивность инвазии.

Таблица 2. Показатели зараженности токсокарами домашних кошек

Год исследования	Котята всего	Из них заражены	ЭИ (%)	Взрослые кошки	Из них заражены	ЭИ (%)	Всего	Из них заражены	ЭИ (%)
2011	19	1	5,26	57	1	1,75	76	2	2,63
2012	51	6	11,76	151	1	0,66	202	7	3,46
2013	56	7	12,5	147	6	4,08	203	13	6,4
2014	57	6	10,5	127	4	3,14	184	10	5,43
2015	56	5	8,92	140	4	2,85	196	9	4,59
2016	51	5	9,1	121	7	5,78	172	12	6,97
2017	26	3	11,53	87	10	11,49	113	13	11,5
Итого	316	33	10,44	830	33	3,97	1146	66	5,75

Примечание: ЭИ — экстенсивность инвазии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В среднем, интенсивность инвазии токсокарами у домашних собак составляет 2,45% (табл. 1). При этом зараженность взрослого поголовья в разные годы исследования варьирует от 0,83 до 2,85%. В зависимости от года исследования показатели интенсивности инвазии у щенков различны и составляли от 2,4 до 10,8%. В целом показатели экстенсивности инвазии у щенков в 2 раза выше, чем у взрослых собак и достигают в среднем 5,53% (рис. 1)

Данные по зараженности домашних кошек токсокарами (табл. 2) показывают, что интенсивность инвазии у взрослых особей составляет 3,97% с минимальным выявлением зараженности в 2012 г. (0,66%) и максимальной зараженностью в 2017 г. (11,49%). Котята, так же как и щенки, интенсивнее заражены токсокарами (10,44%). В целом зараженность кошек токсокарами составляет 5,75%. Исследования показали, что зараженность кошек в 2 раза выше чем собак, как в группе взрослых животных, так и в группе котят (рис. 2 и рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ публикаций по схожим исследованиям показал, что токсокарозная инвазия у собак и кошек стоит на первом месте по частоте выявления, по сравнению с другими кишечными гельминтозами, однако показатели интенсивности инвазии варьируют [4, 18–20]. Так, сообщается, что зараженность взрослых домашних собак составляет 7,3%, щенков — 30,2%, интенсивность инвазии у взрослых кошек доходит до 11,1%, у котят до 33,3% [4]. Наиболее высокая зараженность токсокарозом отмечена при исследованиях бездомных собак и кошек, с максимальными показателями интенсивности инвазии у щенков (100%) и у котят (57,1%) [4]. Такие различия в исследованиях зависят от категории выбранных животных. Например, приведенные нами выше данные по экстенсивности инвазии показали относительно невысокую зараженность домашних собак и кошек токсокарами. Это может быть связано со спецификой паразитологического исследования в коммерческой лаборатории, куда на анализ направляют животных ветеринарные специалисты при подозрении на наличие токсокарозной инвазии или при проведении исследований по желанию владельцев.

Неинтенсивные инвазии с отсутствием клинических симптомов токсокароза зачастую отменяют необходимость заподозрить данный гельминтоз у животного. Безусловно, при поголовном скрининговом исследовании всех домашних собак и кошек показатели интенсивности инвазии будут выше.

Рис. 1. Яйца *T. canis*Рис. 2. Яйцо *T. cati*Рис. 3. Инвазионное яйцо *T. cati*

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало наличие функционирующего очага токсокарозной инвазии на территории мегаполиса Москвы. Данное заболевание является зоонозом и представляет серьезную социальную и медицинскую проблему, поскольку факторами передачи для человека могут быть объекты внешней среды, загрязненные инвазионными яйцами токсокар.

Таким образом, своевременные и регулярные лабораторные исследования, проведение лечебной и

профилактической дегельментизации домашних животных позволят снизить риск обсеменения городской территории яйцами токсокар. Отсутствие подобных мероприятий среди бездомных животных делает их на протяжении долгого времени источником инвазии как для других собак и кошек, так и для людей. Врачам-эпидемиологам необходимо регулярно проводить паразитологические исследования почвы на предмет наличия яиц токсокар в песочницах, рекомендовать Управляющим компаниям устанавливать ограждения, исключающие проникновение бродячих животных на детские площадки.

Литература

1. Пешков Р. А. Эпизоотологическая ситуация по токсокарозу у плотоядных и гельминтологическая оценка внешней среды в мегаполисе Москва [диссертация]. М.: 2010.
2. Пешков Р. А. Гельминтофауна собак и кошек в условиях г. Москвы. В сборнике: Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС. 2007; (8): 277–8.
3. Горохов В. В., Пешкова Р. А., Горохова Е. В. Токсокароз как экологическая проблема. Ветеринарная патология. 2009; (1): 10–12.
4. Панова О. А. Токсокароз плотоядных: методы диагностики и биоэкологические аспекты развития возбудителей в условиях мегаполиса [диссертация]. М.: 2011.
5. Паутова Е. А., Довгалева А. С., Астанина С. Ю. Токсокароз у детей и подростков с аллергическими и бронхолегочными заболеваниями, групп риска по ВИЧ-инфекции, гепатитам В и С (результаты серологического скрининга). Мед. паразитол. 2013; (2): 13–17.
6. Заиченко И. В. Гельминтозы плотоядных городской популяции (распространение, диагностика, лечение) [диссертация]. Ставрополь: 2012.
7. Масалкова Ю. Ю. Особенности воздействия ультразвука на яйца *Toxocara canis*. Российский паразитологический журнал. 2014; (1): 52–56.
8. Гузеева М. В. Современная ситуация по токсокарозу в Москве. Мед. паразитол. 2009; (1): 49–51.
9. Успенский А. В., Пешков Р. А., Горохов В. В., Горохова Е. В. Токсокароз в современных условиях. Мед. паразитол. 2011; (2): 3–6.
10. Сергиев В. П., Лобзин Ю. В., Козлова С. С., редакторы. Паразитарные болезни человека. СПб.: Фолиант; 2006. 592 с.
11. Слободенюк А. В., Косова А. А., Руколева С. И. Особенности распространения токсокароза на территории сельского и городского типа. Мед. паразитол. 2005; (3): 36–8.
12. Гузеева М. В. Современная ситуация по токсокарозу в Москве. Мед. паразитол. 2009; (1): 49–51.
13. Державина Т. Ю. Мониторинг за геогельминтозами у людей в Тульской области. Мед. паразитол. 2010; (30): 42–4.
14. Ермоленко А. В., Румянцев Е. Е., Баркова А. Д., Воронок В. М., Полякова Л. Ф. Нематодозы у людей в Приморском крае. Мед. паразитол. 2013; (1): 31–5.
15. Espinoza Y. A., Huapaya P. E., Roldan W. H. Seroprevalence of human toxocarasis in Andean communities from the Northeast of Lima. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010; 52 (1): 31–36. DOI: 10.1590/S0036-46652010000100006.
16. Fogt-Wyrwas R, Jarosz W, Mizgajski-Wiktor H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. J Helminthol. 2007; 81(1): 75–8. DOI:10.1017/S0022149X07241872.
17. Котельников Г. А. Диагностика гельминтозов животных. М.: Колос; 1974. 240 с.
18. Курносоева О. П. Распространение простейших *Lambia* (*Giardia*) sp. среди собак и кошек города Москвы. Мед. паразитол. 2014; (3): 23–5.
19. Скрипова Л. В. Паразитологическая ситуация на объектах для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения. Здравоохранение. 2010; (6): 22–3.
20. Шишканова Л. В. Токсокароз на юге России (эпизоотологическая, санитарно-паразитологическая и сероэпидемиологическая характеристика) [диссертация]. М.: 2011.

References

1. Peshkov RA. Jepizootologicheskaja situacija po toksokarozu u plotojadnyh i gel'mintologicheskaja ocenka vneshej sredy v megapolise Moskva [dissertacija]. M.: 2010.
2. Peshkov RA. Gel'mintofauna sobak i koshek v uslovijah g. Moskvy. V sbornike: Teorija i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami: materialy dokladov nauchnoj konferencii VIGIS. 2007; (8): 277–8.
3. Gorohov VV, Peshkova RA, Gorohova EV. Toksokaroz kak jekologicheskaja problema. Veterinarnaja patologija. 2009; (1): 10–12.
4. Panova OA. Toksokaroz plotojadnyh: metody diagnostiki i biojekologicheskie aspekty razvitiya vozбудitelej v uslovijah megapolisa [dissertacija]. M.: 2011.
5. Pautova EA, Dovgalev AS, Astanina SJu. Toksokaroz u detej i podrostkov s allergicheskimi i bronholegочnymi zabolevanijami, grupp riska po VICH-infekcii, gepatitam V i S (rezul'taty serologicheskogo skrininga). Med. parazit. 2013; (2): 13–17.
6. Zaichenko IV. Gel'mintozы plotojadnyh gorodskoj populjacii (rasprostranenie, diagnostika, lechenie) [dissertacija]. Stavropol': 2012.
7. Masalkova JuJu. Osobennosti vozdeystvija ul'trazvuka na jajca *Toxocara canis*. Rossijskij parazitologicheskij zhurnal. 2014; (1): 52–56.
8. Guzeeva MV. Sovremennaja situacija po toksokarozu v Moskve. Med. parazit. 2009; (1): 49–51.
9. Uspenskij AV, Peshkov RA, Gorohov VV, Gorohova EV. Toksokaroz v sovremennyh uslovijah. Med. parazit. 2011; (2): 3–6.
10. Sergiev VP, Lobzin JuV, Kozlova SS, redaktory. Parazitarnye bolezni cheloveka. SPb.: Foliant; 2006. 592 s.
11. Slobodenyuk AV, Kosova AA, Rukoleeva SI. Osobennosti rasprostraneniya toksokaroza na territorii sel'skogo i gorodskogo tipa. Med. parazit. 2005; (3): 36–8.
12. Guzeeva MV. Sovremennaja situacija po toksokarozu v Moskve. Med. parazit. 2009; (1): 49–51.
13. Derzhavina TJu. Monitoring za geogel'mintozami u ljudej v Tul'skoj oblasti. Med. parazit. 2010; (30): 42–4.
14. Ermolenko AV, Rumjanceva EE, Bartkova AD, Voronok VM, Poljakova LF. Nematodozy u ljudej v Primorskom krae. Med.

- parazitol. 2013; (1): 31–5.
15. Espinoza Y. A., Huapaya P. E., Roldan W. H. Seroprevalence of human toxocariasis in Andean communities from the Northeast of Lima. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010; 52 (1): 31–36. DOI: 10.1590/S0036-46652010000100006.
 16. Fogt-Wyrwas R, Jarosz W, Mizgajska-Wiktor H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol*. 2007; 81(1): 75–8. DOI:10.1017/S0022149X07241872.
 17. Kotelnikov GA. Diagnostika gel'mintozov zhivotnyh. M.: Kolos; 1974. 240 s.
 18. Kurnosova OP. Rasprostranenie prostejshih *Lambliia* (*Giardia*) sp. sredi sobak i koshek goroda Moskvy. *Med. parazitol*. 2014; (3): 23–5.
 19. Skripova LV. Parazitologicheskaja situacija na ob'ektah dlja pit'evogo i hozjajstvenno-bytovogo vodosnabzhenija. *Zdravoohranenie*. 2010; (6): 22–3.
 20. Shishkanova LV. Toksokaroz na jube Rossii (jepizootologicheskaja, sanitarno-parazitologicheskaja i seroepidemiologicheskaja harakteristika) [disertacija]. M.: 2011.